

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**TÉCNICAS AVANÇADAS NA ANÁLISE DE ALTERAÇÕES**  
**MORFO-FUNCIONAIS DE SÊMEN EQUINO**

**CAMILA DE PAULA FREITAS DELL'AQUA**

Botucatu-SP

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**TÉCNICAS AVANÇADAS NA ANÁLISE DE ALTERAÇÕES**  
**MORFO-FUNCIONAIS DE SÊMEN EQUINO**

**CAMILA DE PAULA FREITAS DELL'AQUA**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em  
Medicina Veterinária (Área de concentração:  
Reprodução Animal) para a obtenção do título de  
Doutor

Orientador: Prof. Tit. Frederico Ozanam Papa

Botucatu-SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Freitas-Dell'Aqua, Camila de Paula.

Técnicas avançadas na análise de alterações morfofuncionais de sêmen equino / Camila de Paula Freitas Dell'Aqua. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504002

1. Equino. 2. Sêmen. 3. Fecundidade.

Palavras-chave: Alterações morfofuncionais; Equino; Espermatozóide; Fertilidade; Preservação espermática.

**NOME DO AUTOR:** Camila de Paula Freitas Dell'Aqua

**TITULO:** Técnicas avançadas na análise de alterações morfofuncionais de sêmen equino

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

Prof. Tit. Frederico Ozanam Papa (Presidente e Orientador)

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

Prof. Tit. Rubens Paes de Arruda (Membro)

Departamento de Reprodução Animal  
FMVZ – USP – Pirassununga

Prof. Adj. André Maciel Crespilho (Membro)

Curso de Medicina Veterinária  
Universidade Severino Sombra – USS - Vassouras/RJ

Prof. Tit. Fernanda da Cruz Landim (Membro)

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

Prof. Tit. Maria Denise Lopes (Membro)

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

**DATA DA DEFESA:** 14 de dezembro de 2011

# DEDICATÓRIA

*Ao meu pai,*

que me propiciou uma vida digna onde eu pudesse crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos, íntegros de caráter e tendo a convicção de que desistir nunca seja uma ação contínua em nossas vidas.

*Aos meus filhos, ao meu marido, à minha mãe e irmãs,*

por terem sentido junto comigo, todas as angústias e felicidades, acompanhando cada passo de perto. AMO VOCÊS!

## AGRADECIMENTOS

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

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu marido e filho pela paciência.

Aos meus colegas de pós-graduação, Priscila, Rosiára, Aline, Patrícia, Ian e Cely pela companhia e apoio. Ao Gabriel pela ajuda durante todo o experimento.

Ao meu orientador Prof. Tit. Frederico Ozanam Papa pela orientação e ensinamentos.

À banca examinadora, Professor Rubens Paes de Arruda, Professora Fernanda da Cruz Landim, Professora Maria Denise Lopes e Professor André Maciel Crespilho.

Aos funcionários de Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, pela dedicação e auxílio.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização de mais esta etapa em minha vida.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

H342 – Hoechst 33342

IP – Iodeto de propídio

CDFA - diacetado de 6-carboxifluoresceína

FITC–PSA – Fluoroisothiocinato conjugado a *Psium sativun*

PE-PNA – Ficoeritrina conjugado a *Arachis hypogae*

JC-1 – 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide

SCSA – “Sperm Chromatin Structure Assay” – Análise da estrutura da cromatina espermática

FITC–VAD–Fmk – Fluoroisothiocianto conjugado a inibidores de caspase permeáveis à células

MPLAI – Membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra

MPAL – Membrana plasmática e acrossomal lesadas

MPAI – Membrana plasmática e acrossomal íntegras

MPIAL – Membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada

APM – Alto potencial de membrana mitocondrial

MPM – Médio potencial de membrana mitocondrial

BPM – Baixo potencial de membrana mitocondrial

MT – motilidade espermática total

MP – motilidade espermática progressiva

VAP – velocidade de trajeto

VSL – velocidade linear

VCL – velocidade curvilínea

RAP – porcentagem de espermatozoides com movimento rápido

IFD – índice de fragmentação de DNA

**LISTA DETABELAS**

|  |           |
|--|-----------|
| Tabela 1 – Média e desvio padrão das características do movimento espermático obtidos após análise computadorizada do sêmen <i>in natura</i> mantidos em temperatura ambiente (18-22°C) nos momentos 0 hora, 3 horas, 6 horas e 12 horas, após colheita do ejaculado de seis garanhões.....  | <b>23</b> |
| Tabela 2 – Média e desvio padrão das características espermáticas obtidas após análise por microscopia de epifluorescência do sêmen <i>in natura</i> mantidos em temperatura ambiente (18-22°C) nos momentos 0 hora, 3 horas, 6 horas e 12 horas, após colheita do ejaculado de seis garanhões.....  | <b>24</b> |
| Tabela 3 – Correlações entre as características do movimento espermático e da análise morfofuncional do sêmen <i>in natura</i> às 0h.  | <b>25</b> |
| Tabela 4 – Correlações entre as características do movimento espermático e da análise morfofuncional do sêmen <i>in natura</i> às 3h.  | <b>26</b> |
| Tabela 5 – Correlações entre as características do movimento espermático e da análise morfofuncional do sêmen <i>in natura</i> às 6h   | <b>27</b> |
| Tabela 6 – Classificação dos animais utilizados no experimento de acordo com a sua fertilidade (porcentagem calculada pelos dados de prenhez/número de inseminações - %). .....  | <b>48</b> |
| Tabela 8 – Média e desvio padrão dos parâmetros avaliados por meio da análise computadorizada do sêmen e por citometria de fluxo dos grupos G1 (garanhões com alta fertilidade, n=8), G2 (garanhões de média fertilidade, n=8), G3 (garanhões de baixa fertilidade, n=8) das amostras de sêmen congelado-descongelado de garanhão nos momentos 0h e 4h pós-descongelção..... | <b>55</b> |



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Gráficos ilustrando as modificações ocorridas na cinética espermática ocorrida nos diferentes grupos e momentos: Fresco – 0h; 12h 5°C – refrigerado por 12h à 5°C; 12h 15°C – refrigerado por 12h à 15°C; 24h 5°C – refrigerado por 24h à 5°C; 24h 15°C – refrigerado por 24h à 15°C..... 43
- Figura 2** – Gráficos ilustrando as modificações morfofuncionais ocorridas nos diferentes grupos e momentos: Fresco – 0h; 12h 5°C – refrigerado por 12h à 5°C; 12h 15°C – refrigerado por 12h à 15°C; 24h 5°C – refrigerado por 24h à 5°C; 24h 15°C – refrigerado por 24h à 15°C; Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ )..... 44
- Figura 3:** Gráfico *dot-plot* gerados pela análise de células por citometria de fluxo. Amostra para avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal utilizando a associação de H342, IP e FITC-PSA permitindo a classificação dos espermatozóides eqüinos em quatro classes: MPLAI- Membrana plasmática lesada e acrossomal integra; MPAL- Membrana plasmática e acrossomal lesadas; MPAI- Membrana plasmática e acrossomal integras; e, MPIAL Membrana plasmática integra e acrossomal lesada..... 49
- Figura 4:** Gráfico *dot-plot* gerados pela análise de células por citometria de fluxo. Amostra para avaliação do potencial mitocondrial utilizando o fluorocromo JC-1, permitindo a classificação dos espermatozóides eqüinos em três classes: APM-Alto potencial mitocondrial; MPM- Médio potencial mitocondrial; e, BPM- Baixo potencial mitocondrial..... 50
- Figura 5:** Dados de SCSA de sêmen obtido de garanhão de alta fertilidade (A e B) e Baixa fertilidade (C e D). De acordo com o gráfico *dot-plot* gerado em A, a população é mais homogenia, enquanto que no gráfico C é mais heterogenia (células fora da população principal – AlfaCOMP)..... 51

**Figura 6:** Gráfico *dot-plot* gerados pela análise de células por citometria de fluxo. Amostra para avaliação da ativação de caspase utilizando a associação de H33342, IP e FITC-VAD-Fmk permitindo a classificação dos espermatozoides eqüinos em quatro classes: Q1- células mortas; Q2- células semi-mortas; Q3- células viáveis; e, Q4- células apoptóticas..... **52**

**Figura 7:** Gráfico *dot-plot* gerados pela análise de células por citometria de fluxo. Amostra para avaliação da translocação de fosfolipídios de membrana utilizando a associação de H33342, IP e FITC Anexina permitindo a classificação dos espermatozoides eqüinos em quatro classes: células mortas; células semi-mortas; células viáveis; e, células apoptóticas..... **53**

## SUMÁRIO

### **Capítulo 1**

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Introdução.....            | 1 |
| Hipótese.....              | 3 |
| Objetivos.....             | 3 |
| Revisão Bibliográfica..... | 4 |

### **Capítulo 2 – Trabalho científico 1**

|  |    |
|--|----|
| Modificações das características morfofuncionais do sêmen equino mantido a temperatura ambiente..... | 19 |
|--|----|

### **Capítulo 3 – Trabalho científico 2**

|   |    |
|---|----|
| Modulação das características morfofuncionais do sêmen equino através de dois sistemas de refrigeração passiva..... | 34 |
|---|----|

### **Capítulo 4 – Trabalho científico 3**

|   |    |
|---|----|
| Relação dos marcadores da qualidade espermática com a fertilidade do sêmen descongelado de garanhões..... | 45 |
|---|----|

### **Capítulo 5**

|                        |    |
|------------------------|----|
| Conclusões Gerais..... | 63 |
| <b>Anexos</b> .....    | 64 |

## RESUMO

FREITAS-DELL'AQUA, C.P. **Técnicas avançadas na análise de alterações morfofuncionais de sêmen eqüino**. Botucatu, 2011, 99p, Tese (doutorado). Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

As biotécnicas de refrigeração e congelação podem causar danos irreversíveis à célula espermática devido ao estresse gerado pela queda de temperatura ou, no caso da criopreservação, pela formação de cristais de gelo intracelulares. Estas alterações resultam na diminuição da longevidade do espermatozóide no trato reprodutor da fêmea e, conseqüentemente, na queda dos índices de fertilidade. Sabendo-se que as alterações das características espermática afetam a viabilidade do sêmen sobre as diferentes formas de preservação seminal e que ganhões de diferentes taxas de fertilidade nem sempre apresentam diferenças significativas nas análises seminais padrões, faz-se necessário uma análise mais específica da células espermática, como a avaliação de vários parametros funcionais em células individuais, o que possivelmente reduziria as incertezas inerentes a previsão da fertilidade na avaliação *in vitro* do sêmen. Para comprovação desta hipótese três experimentos foram realizados. No experimento 1 o objetivo foi identificar e avaliar as principais modificações ocorridas nas características morfofuncionais do sêmen equino estocado a temperatura ambiente (18-22°C) por um período de 12 horas. No experimento 2 o objetivo foi verificar a possibilidade de modular estas alterações através de duas temperaturas de refrigeração (5°C e 15°C), e, no experimento 3, o objetivo foi avaliar e verificar a relação destas alterações com os índices de fertilidade em sêmen congelado. Para os experimentos 1 e 2, três ejaculados de seis diferentes ganhões foram avaliados quanto a cinética espermática através da análise computadorizada do movimento espermático; para a avaliação morfofuncional foram avaliadas a integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, índice de fragmentação de DNA, ativação de caspase e translocação de fosfolipídios de membrana por meio de microscopia de epifluorescência; no exp 1 as avaliações ocorreram nos momentos 0, 3, 6 e 12h a temperatura ambiente (18-22°C), no exp 2 cada ejaculado foi aliquotado em duas frações iguais, uma para refrigeração à 5°C e outra à 15°C e avaliados nos momentos 0h, 12h e 24h após refrigeração. No experimento 1, após a avaliação da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, os dados foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de Tukey para determinar diferenças significativas nas variáveis entre grupos, com nível de significância  $p < 0,05$ , e realizada correlação de Pearson entre os parametros avaliados pelo CASA e por microscopia de fluorescência. Houve queda da

qualidade espermática no decorrer do tempo, entre o período de 3 a 6 horas as alterações foram semelhantes a capacitação e após o período de 6 horas devido a exaustão celular as alterações foram semelhantes a apoptose. No experimento 2, após a avaliação da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, os dados foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de Tukey, com nível de significância  $p < 0,05$ . De acordo com os resultados ocorreu falência metabólica principalmente no período de 24h, sendo mais acentuada à temperatura de 15°C, já para a temperatura de 5°C apenas os parâmetros de potencial de membrana mitocondrial e ativação de caspase foi inferir ao sêmen fresco; para o período de 12h não houve queda significativa em ambas as temperaturas. Portanto, as amostras seminais foram melhores preservadas à 5°C do que à 15°C pelo período de 24h e por 12 horas não há influência da temperatura. No Experimento 3 um “pool” de 3 palhetas de 4 diferentes partidas de sêmen congelado de 6 garanhões com fertilidade conhecida foram descongeladas à 46°C/20 segundos e analisadas às 0 e 4h pós descongelação. As avaliações foram realizadas por meio da análise computadorizada do sêmen e por citometria de fluxo, após a avaliação da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, os dados foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos de alta, média e baixa fertilidade e *unpaired t test* para as análises em relação ao tempo, para correlação com a fertilidade utilizou-se a análise de regressão múltipla, para todos os testes foi considerado nível de significância  $p < 0,05$ . De acordo com os resultados houve diferença para os parâmetros de motilidade total, integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, células viáveis sem ativação de caspases e para células viáveis sem translocação de fosfolípidos de membrana entre o grupo de alta fertilidade em relação aos demais. A motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos foi diferente entre os grupo de alta e baixa fertilidade enquanto o grupo de média fertilidade foi semelhante a ambos. O índice de fragmentação de DNA foi o parâmetro que mais qualificou aqueles com baixa fertilidade. Os resultados obtidos da análise de regressão múltipla com a fertilidade mostraram que a análise à 0h apresentou  $r^2 = 77,26\%$ , as análises às 4h obteve-se  $r^2 = 82,98$  e quando se associou as duas,  $r^2 = 96,42\%$ . Por tanto, quando efetuadas diversas análises é possível identificar diferenças entre animais de alta e baixa fertilidade e que a associação destes marcadores com a fertilidade do sêmen apresentou um alto coeficiente de determinação o que pode reduzir as incertezas inerentes a previsão da fertilidade na avaliação in vitro do sêmen

Palavras chaves: equino, preservação espermática, alterações morfofuncionais, fertilidade, espermatozoide

## ABSTRACT

FREITAS-DELL'AQUA, C.P. **Advanced techniques in the analysis of the morphological functional changes of equine semen.** Botucatu, 2011, 72p, Tese (doutorado). Unesp – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Cooling and freezing can cause irreversible damage to sperm cells due to the stress generated by the decrease in temperature or, in the case of cryopreservation, the formation of intracellular ice crystals. These changes result in decreased longevity of sperm in the female reproductive tract and, consequently, a decrease in fertility rates. The changes in sperm characteristics affect the viability of the semen, and these changes vary based on the different preservation techniques used to preserve the semen from different stallions. In addition, fertility rates do not always show significant differences in semen analysis patterns. Therefore, a more specific analysis of sperm cells is necessary. This analysis should include a functional assessment of multiple parameters in individual cells, which might reduce uncertainties in the prediction of fertility based on the *in vitro* evaluation of semen. To test this hypothesis, three experiments were performed. In experiment 1, the objective was to identify and assess the main characteristic morph functional changes in equine semen that is stored at room temperature (18-22°C) for a period of 12 hours. In experiment 2, the objective was to determine the possibility of modulating these changes using two refrigeration temperatures (5°C and 15°C). In experiment 3, the objective was to evaluate and compare the influence of these changes on fertility rates between semen at various temperatures and in frozen semen. For experiments 1 and 2, the sperm kinetics of three different ejaculates from six stallions were evaluated using a computerized analysis of sperm motility. For morphological and functional assessments, the following parameters were evaluated: plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential, rate of DNA fragmentation, caspase activation and the translocation of membrane phospholipids based on epifluorescence microscopy. In exp 1, the assessments were performed at room temperature at 0, 3, 6 and 12 h. In exp 2, each ejaculate was aliquoted into two equal fractions, one of which was cooled to 5°C and the other cooled to 15°C; these fractions were evaluated at 0, 12 and 24 h after cooling. For statistical analyses, the Kolmogorov-Smirnov test was used to test for normality. The data were subjected to analysis of variance followed by the Tukey test to determine significant differences in the variables between groups, with a significance level of  $p < 0.05$ . Pearson correlation between the parameters was evaluated based on CASA and fluorescence microscopy (only in exp 1). There was a decrease in sperm quality over time; between 3 h

and 6 h, the changes were similar to capacitation, and after 6 h, the cell changes were similar to apoptosis due to depletion of nutrients. In experiment 2, the results suggest that metabolic resources became completely depleted, especially after 24 h. This was most pronounced at a temperature of 15°C, whereas for the temperature of 5°C, only the mitochondrial membrane potential and caspase activation parameters differed from those of fresh semen. After 12 h, there were no significant changes for either temperature. Therefore, semen samples were preserved better at 5°C than at 15°C over 24 h, whereas there was no influence of temperature over 12 h. In experiment 3, a "pool" of three different samples each of 4 ejaculates of frozen semen from six stallions with known fertility were thawed at 46°C for 20 s and analyzed at 0 and 4 h after thawing. The evaluations included computer analysis of the semen and flow cytometry. After the evaluation of normality with the Kolmogorov-Smirnov test, data were subjected to an analysis of variance, followed by a Tukey test for comparison between the high, medium and low fertility groups. An unpaired t test was used for the analysis over time, and a multiple regression analysis was used to determine the correlation with fertility; for all tests, the significance level was set at  $p < 0.05$ . The differing results for the parameters of total motility, plasma membrane and acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, viable cells without activation of caspases and viable cells without membrane translocation of phospholipids suggest that these parameters may be indicators of high fertility. Progressive motility and the percentage of fast spermatozoa differed between the high and low fertility groups, whereas these parameters were similar when fertility was average. The presence of DNA fragmentation was most strongly associated with low fertility. The results of multiple regression analysis of fertility showed that  $r^2 = 77.26$  at 0 h,  $r^2 = 82.98$  at 4 h, and  $r^2 = 96.42$  when these two time points were combined. Therefore, when several analyses were performed, it was possible to identify differences between the high and low fertility animals. In addition, the association of these markers with semen fertility showed a high predictive value which can reduce the uncertainties in the prediction of fertility during the in vitro evaluation of semen.

Keywords: equine, sperm preservation, morphofunctional changes, fertility, sperm

# Capítulo 1



## INTRODUÇÃO

As biotécnicas de refrigeração e congelamento podem causar danos irreversíveis à célula espermática devido ao estresse gerado pela queda de temperatura ou, no caso da criopreservação, pela formação de cristais de gelo intracelulares. Estas alterações resultam na queda de longevidade do espermatozóide no trato reprodutor da fêmea e consequentemente, menor fertilidade. Na espécie equina existe uma grande variação individual entre ganhões na manutenção da viabilidade espermática durante os processos de refrigeração e congelamento do sêmen, independente da metodologia ou meio diluidor utilizado. Fato observado principalmente na raça Mangalarga Marchador que apresenta uma maior sensibilidade da célula espermática para estas biotecnologias.

Todas as organelas/estruturas e moléculas presentes no espermatozóide são de extrema importância para a realização das etapas da fertilização que resultam no desenvolvimento embrionário normal. Assim, a célula espermática precisa membranas plasmática e acrossomal intactas, motilidade, energia, habilidade de iniciar a capacitação, DNA normal, habilidade de se ligar a zona pelúcida e outros atributos (BARROSO et al., 2009). A avaliação prévia da capacidade fertilizante da célula espermática é pré-requisito para as técnicas de reprodução assistida e com isso existe a necessidade de avaliação da célula como um todo, ou seja, seus diferentes compartimentos.

Avaliar o potencial de fertilização de uma amostra de sêmen, seja ela fresca, refrigerada ou congelada tem sido o objetivo de muitos pesquisadores voltados ao estudo de diferentes espécies. Os testes laboratoriais convencionais incluem a avaliação da concentração espermática, volume do sêmen, características morfológicas e padrões do movimento espermático inicial e após armazenagem (VARNER, 2008). Na espécie equina a fertilidade varia entre os ganhões, mesmo quando estes reúnem as qualidades seminais mínimas. Neste contexto, vários métodos laboratoriais para avaliação do sêmen vêm sendo utilizados. Estes em conjunto, podem ajudar a prever seu potencial fecundante (ARRUDA et al., 2007).

A avaliação seminal utilizada nos laboratórios de andrologia e centrais de congelamento de sêmen consiste basicamente da análise subjetiva da motilidade (antes e após estresse térmico), concentração, morfologia e integridade acrossomal. Em laboratórios de centros universitários encontram-se também avaliação da motilidade através da análise computadorizada da cinética espermática e análises morfofuncionais com a utilização de sondas fluorescentes através de microscopia de epifluorescência. Entretanto, estes métodos nem sempre se correlacionam com a fertilidade.

A descoberta de uma variedade de fluorocromos e sondas fluorescentes tornaram possível uma análise mais detalhada da qualidade do sêmen em níveis bioquímicos, ultra-estruturais e funcionais. Assim o objetivo deste trabalho foi destacar algumas das análises laboratoriais que podem ser utilizadas atualmente para a avaliação das características espermáticas de garanhões na tentativa de identificar marcadores da qualidade e fertilidade de espermatozoides.

## **HIPOTESE**

A avaliação de vários parâmetros morfofuncionais em células individuais possivelmente reduzirá as incertezas inerentes a previsão da fertilidade na avaliação *in vitro* do sêmen.

## **OBJETIVO GERAL**

Identificar marcadores da qualidade e fertilidade de espermatozoides equinos

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar e avaliar as principais modificações ocorridas nas características morfofuncionais do sêmen equino estocado a temperatura ambiente (18-22°C) por um período de 12 horas;
2. Verificar a possibilidade de modular estas alterações através de duas temperaturas de refrigeração (5°C e 15°C);
3. Avaliar e verificar a relação destas alterações com os índices de fertilidade em sêmen congelado;

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. A célula espermática

Didaticamente o espermatozóide é dividido em cabeça e flagelo ou cauda, este ainda é subdividido em peça intermediária, peça principal e peça terminal, envoltos pela membrana plasmática. Ainda, a cabeça do espermatozóide é formada pelo acrossomo, a lâmina pós-acrosomal, e o núcleo. Os dois terços anteriores do núcleo é sobreposto pelo acrossoma, que é uma vesícula especializada formada a partir do complexo de Golgi, uma membrana de duas camadas que contém enzimas hidrolíticas essenciais para a penetração do espermatozóide do oócito. O *perforatorium* é um acúmulo em forma de cone de material denso de elétrons entre o acrossomo e da porção anterior do núcleo e a lâmina pos-acrosomal é composto por lamelas de alta densidade de elétrons que recobre a parte caudal do núcleo e o anel caudal. O núcleo compromete a maior parte da cabeça do espermatozóide e contém o material genético na forma de DNA altamente condensado, e é contido por um envelope nuclear de dupla camada. A base do núcleo termina com a fossa de implantação, onde a camada externa do envelope nuclear espessa para formar a placa basal, que prevê a fixação da cabeça para o *capitulum* do pescoço. A fronteira entre a cabeça e o pescoço é claramente definida por um anel posterior e corresponde ao local de fixação da membrana plasmática com o envelope nuclear na base da cabeça (BRITO, 2007).

#### 1.1. Membrana plasmática

A membrana plasmática é formada por uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um mosaico fluido. Seus componentes são segregados dentro de regiões específicas e domínio, sendo eles: a cabeça, a peça intermediária e o flagelo (GADELLA e HARRISON, 2000). Assim, sua integridade é essencial para o metabolismo normal do espermatozóide, capacitação e reação acrossômica, podendo ser também usado para avaliar a viabilidade do espermatozóide (JANUSKAUSKAS et al., 2000; GARNER et al., 1997).

#### 1.2. Membrana Acrossomal

O acrossomo é derivado do complexo de Golgi sendo composto por enzimas hidrolíticas organizadas em um tipo de matriz (RAMALHO-SANTOS et al., 2002). A ligação do espermatozóide com a zona pelúcida provoca a reação acrossômica resultando

na liberação e ativação das enzimas acrossomais. Este processo associado a hiperativação da motilidade ajudará o espermatozóide a penetrar à zona pelúcida e fertilizar o ovócito (HONDA et al., 2002). Assim, para que ocorra a fertilização o acrossomo deve permanecer intacto antes e durante o trânsito pelo trato reprodutor da fêmea até que ocorra a ligação com a zona pelúcida. Quando a reação acrossômica ocorre prematuramente pode-se observar uma queda no índice de fertilidade do sêmen (SILVA e GADELLA, 2006).

### ***1.3. Núcleo***

A formação do espermatozóide consiste em um processo único envolvendo uma série de mudanças meióticas e mitóticas das espermatogônias. A substituição das histonas com a transcrição de proteínas e adição final de protaminas leva a uma cromatina organizada e acondicionada de maneira singular. O DNA espermático, que ocupa praticamente todo o núcleo, é organizado de forma específica mantendo a cromatina no núcleo compacta e estável (D'OCCHIO, et al., 2007). Nos estudos em humanos e eqüinos observa-se correlação negativa entre fertilidade e integridade de DNA (MORRELL et al., 2008). Assim, a concepção depende, entre outros fatores, da habilidade da cromatina espermática previamente condensada em se descondensar e formar o pronúcleo masculino durante a interação com o ovócito (MADRID-BURY et al., 2005).

### ***1.4. Bainha mitocondrial***

Na peça intermediária está localizada a bainha mitocondrial que contém as mitocôndrias que são as organelas responsáveis pela produção de ATP através de fosforilação oxidativa que serve como suplemento energético para os batimentos flagelares (COSSON, 1996). Além disso, as mitocôndrias também são responsáveis pela produção de ATP para a manutenção celular requerida tanto pela cabeça quanto pelo flagelo. O ATP é importante, entre outros fatores, para o processo de manutenção da bomba de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , responsável pela regulação química e no transporte de gradientes eletrolíticos. Assim a integridade funcional da mitocôndria é um aspecto importante para a sobrevivência da célula no trato reprodutivo da fêmea durante as técnicas de reprodução assistida (SILVA e GADELLA, 2006).

## **2. Análise espermática**

Existem diversas variáveis envolvidas na manutenção da viabilidade e longevidade do sêmen, tais como: fatores físicos, morfológicos, bioquímicos e metabólicos inerentes à

célula espermática. Esta é constituída de vários compartimentos, tais como membrana plasmática, membrana acrossomal e bainha mitocondrial e para o funcionamento normal da célula é necessário que todos os compartimentos estejam com suas funções preservadas (GRAHAM et al., 1980).

Para que a inseminação artificial possa apresentar melhores resultados na espécie eqüina, é necessário um estudo mais amplo sobre os vários aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática e à melhoria dos testes aplicados para analisar a viabilidade dos espermatozóides submetidos à refrigeração, congelação e descongelação, uma vez que os danos ocasionados pela criopreservação causam prejuízos às funções celulares, resultando na queda dos índices de fertilidade (ARRUDA et al., 2007).

### ***2.1. Análise computadorizada do movimento espermático***

Convencionalmente, o principal teste para a qualidade do sêmen têm sido a estimativa da porcentagem de células móveis. Embora comum, esse teste não é completamente confiável e nem apresenta repetibilidade (GRAHAM et al., 1980), já que os procedimentos de manipulação do sêmen, a qualidade do microscópio e a experiência do avaliador podem causar projeções erradas da real qualidade seminal. Com a análise computadorizada do sêmen, pôde-se padronizar a motilidade espermática de cada espécie e obter maior objetividade e repetibilidade (DAVIS e SIEMERS, 1995). Ferreira et al. (1997) concluíram que o método de análise computadorizada mostrou-se prático, rápido e de fácil execução. Além disso, a avaliação automatizada da motilidade dos espermatozóides é importante devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozóides (ARRUDA, 2000; VERSTEGEN et al., 2002, MATOS et al., 2008).

De acordo com Amann e Katz (2004) as informações obtidas pelo equipamento podem ser tanto da cinética individual de cada células quanto em valores médios de uma população, os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozóide

Segundo Arruda et al. (2011), o grande desafio para se trabalhar com o sistemas de análise computadorizada do movimento espermático é padronizar os procedimentos laboratoriais adotados para a análise objetiva, assim é necessário a padronização da concentração, diluição com meios que não interfiram na motilidade e o uso da ferramenta IDENT que se baseia na utilização da sonda Hoeschst 33342 para contagem dos espermatozóides eliminando os debris que podem ser identificados como células imóveis.

### **2.2. Integridade de membrana plasmática**

A avaliação da membrana plasmática é um indicador adequado para a viabilidade do espermatozóide uma vez que as membranas são extremamente suscetíveis a danos do meio externo (PARKS e GRAHAM, 1992; HARRISON, 1997; HOLT e MEDRANO, 1997). Sua integridade pode ser avaliada através de corantes fluorescentes supravitais que dependem da capacidade das membranas intactas de excluí-los do compartimento interno do espermatozóide (GRAHAM et al., 1990; ALTHOUSE e HOPKINS, 1995; GRAVANCE et al., 2001). Geralmente, essas sondas discriminam as células mortas e vivas, apesar de um terceiro grupo de células danificadas ou “morrendo”, poder ser reconhecido quando duas colorações são utilizados (ERIKSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000).

A associação mais consagrada é a combinação de diacetado de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP) de acordo com Garner et al. (1986). A CFDA é um fluocromo permeável a membrana espermática não fluorescente, mas a hidrólise deste éster, pelas esterases intracelulares, resulta na formação de uma fluorescência impermeável a membrana. O iodeto de propídio é um fluocromo específico para DNA e é impermeável a membrana, não penetrando em células com membrana intacta. (GARNER et al., 1986). A associação destes dois fluocromos tem sido usada para avaliação de sêmen em várias espécies de mamíferos (GARNER et al., 1984)

Também para a avaliação de integridade de membrana plasmática Garner et al., (1994) relataram o uso de uma combinação de duas sondas fluorescentes, SYBR 14 (de coloração verde e permeável a membrana) e iodeto de propídio (coloração vermelha e impermeável a membrana íntegra), ambos tem como alvo o DNA da célula. Esta associação de SYBR 14 e iodeto de propídio é um método rápido e eficaz para determinar a proporção de espermatozoides vivos e mortos (GARNER e JOHNSON, 1995; GARNER et al., 1997; THOMAS et al., 1997).

### **2.3. Integridade de membrana acrossomal**

A integridade acrossomal é comumente avaliada através do uso de lecitina conjugada com sondas fluorescentes. A lecitina se liga a glicoproteínas que são exclusivamente localizados no acrossomo (SILVA e GADELLA, 2006). Dependendo da espécie, a lecitina mais utilizada é *Pisum sativum* (PSA) ou *Arachis hypogae* (PNA). Estas lecitinas podem ser conjugadas a sondas fluorescentes como FITC (ex/em 488/515 nm comprimento de onda) (SAZSZ et al., 2000) ou ainda a ficoeritrina-PE (NAGY et al., 2003).

A sonda fluorescente mais utilizada para avaliação da integridade da membrana acrossomal é a isothiocianate (FITC) conjugada a aglutinina *Pisum sativum* (PSA) associadas ao IP (GRAHAM et al., 1990). Células espermáticas com acrossomo intacto não apresentam fluorescência, pois são impermeáveis ao FITC-PSA, já as células que apresentam lesão de acrossoma fluorescem em verde. E a combinação com o IP torna fácil a análise, pois, as células são facilmente diferenciadas dos eventos não celulares (SZASZ et al., 2000).

#### ***2.4. Marcadores apoptóticos***

Mesmo em indivíduos normospérmico a apoptose pode detectada em uma pequena porcentagem de espermatozóides no ejaculado. Entretanto, a apoptose nos testículos também pode apresentar falhas, o que contribui para a má qualidade do sêmen (SIMÕES, 2008). Neste caso, ocorre o processo conhecido como apoptose abortiva, no qual algumas células escapam das etapas finais do processo de morte celular e aumentam a população de células anormais no ejaculado (SHAMSI et al., 2008)

Segundo Camara et al. (2008) tendo em vista que não ocorre transcrição e translação nas células espermáticas, alternativas têm sido propostas para a ocorrência de apoptose neste gameta, tais como atividade de endonucleases que culminam com a fragmentação do DNA (SAKKAS et al., 1995) ou mediação por proteínas da superfície celular (LEE et al., 1997). A seqüência normal de eventos que determinam a apoptose, de acordo com Kroemer et al. (1997), é a diminuição do potencial de membrana mitocondrial procedido pela fragmentação do DNA nuclear, a produção de espécies reativas ao oxigênio e, finalmente, o aumento na permeabilidade da membrana.

##### ***2.4.1. Potencial mitocondrial***

Os eventos apoptóticos têm início na mitocôndria (CAMARA et al., 2008), essas organelas são requeridas para o eficiente metabolismo energético, a manutenção dos lipídeos de membrana e o crescimento celular, mas também são as determinantes primárias da vida ou da morte celular (ARENDS e WYLLIE, 1991). O envolvimento da mitocôndria na apoptose inclui a ativação de cisteínas conhecidas como caspases, a perda do potencial de membrana mitocondrial (PMM), as variações no potencial de oxi-redução e o envolvimento de proteínas pró e antiapoptose, como a Bcl-2 (DONNELLY et al., 2000).

A sonda para avaliação do potencial de membrana mitocondrial é 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) que permite a distinção entre espermatozóides com baixa e alta função (GADELLA e HARRISON,



2002). JC-1 é uma sonda fluorescente carbocianina lipofílica catiônica que é internalizada pelo funcionamento das mitocôndrias e fluoresce em verde. Quando em alta função mitocondrial a concentração de JC-1 dentro das mitocôndrias aumenta e a coloração forma agregados que fluorescem em laranja (GILLIAN et al., 2005). Uma das associações para avaliação simultânea da viabilidade e potencial mitocondrial é a associação de SYBR-14/IP/JC-1. Mas para isto é necessário um citômetro de fluxo que apresente os filtros de 535 nm para fluorescência verde, tanto para integridade de membrana plasmática (SYBR-14) quanto para baixa função mitocondrial (JC-1) e outro de 595 nm para detecção de fluorescência vermelha, para lesão de membrana (IP) e alta função mitocondrial (JC-1 agregados) (GRAVANCE et al., 2001; HUO et al., 2002; LOVE et al., 2003).

#### 2.4.2. Fragmentação de DNA

A fragmentação do DNA genômico é considerada um dos marcadores da apoptose, conhecida como a forma mais comum de morte das células eucarióticas (DONNELLY et al., 2000). Isto pode alterar a capacidade de fertilização destas células ou em etapas mais tardias, como alterações no desenvolvimento embrionário, casos de abortamento ou fetos com defeitos congênitos (HENKEL et al., 2004; SACKKAS e ALVAREZ, 2010).

Nos estudos em humanos e eqüinos; observa-se correlação negativa entre fertilidade e integridade de DNA (AGARWAL e SAID, 2003; LOVE, 2005; MORRELL et al., 2008). Assim, a concepção depende, entre outros fatores, da habilidade da cromatina espermática previamente condensada em se descondensar e formar o pronúcleo masculino durante a interação com o ovócito (MADRID-BURY et al., 2005).

O aumento da susceptibilidade à desnaturação do DNA denota a heterogeneidade da estrutura da cromatina, relacionando-se a distúrbios da espermatogênese e teratozoospermia (EVENSON et al., 1980). Como o desenvolvimento embrionário inicial depende da integridade do DNA espermático (RODRIGUES-MARTINEZ, 2005), o acesso à estabilidade do material genético dos espermatozoides pode proporcionar informações adicionais sobre a qualidade das amostras seminais.

A análise estrutural da cromatina espermática é realizada submetendo a célula a um ambiente ácido e verificando a susceptibilidade do DNA à desnaturação, entre outros métodos, com o uso da acridina laranja. O corante se intercala à dupla fita de DNA e fluoresce em verde quando esta se apresenta íntegra. Todavia, quando associada a uma porção desnaturada da fita de DNA ou ao RNA, a acridina emite fluorescência laranja, permitindo a quantificação de desnaturação do DNA das células de uma amostra (LOVE, 2005).

### 2.4.3. Ativação de caspase

Muitas das alterações morfológicas apresentadas pelas células em apoptose são causadas por proteases específicas chamadas caspases (SIMÕES, 2008). A cascata apoptótica é muito complexa, pois quase todas as proteínas envolvidas estão presentes no citosol, apenas esperando para serem ativadas (BUSTAMANTE FILHO et al., 2005).

O proto-oncogene Bcl-2 aumenta a sobrevivência celular pela supressão da apoptose. Porém, alguns membros da família Bcl-2 têm efeito oposto e atuam como promotores da apoptose. A Bcl-2 é uma proteína de membrana localizada na bainha mitocondrial interna, na membrana nuclear externa e no retículo endoplásmico liso e rugoso. A associação com a membrana mitocondrial faz com que Bcl-2 exerça seu papel, mantendo a polarização da membrana. O equilíbrio entre os membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 é crítico para a sobrevivência celular (ADAMS e CORY, 1998; PAASCH et al., 2004).

As proteínas apoptóticas Bax e Bak são ativadas via p53 e caspase-2 após dano no DNA. Essas proteínas atuarão despolarizando a mitocôndria, o que resulta na liberação de diversos agentes apoptóticos, entre eles o citocromo c, que junto com a caspase-9 e Apaf-1, formarão o apoptossomo, capaz de ativar outras caspases efetoras (SANTOS, 1999; CONCANNON et al., 2003).

Estudos têm demonstrado a existência de caspase-dependente no percurso para a apoptose no ejaculado de homens (SAID et al., 2004; MARCHETTI e MARCHETTI, 2005). Caspase ativadas foram detectadas em espermatozoides vivos quando se utilizou carboxifluoresceína (PAASCH et al., 2003). Foi demonstrado também que a associação de FITC-Val-Ala-Asp-FMK (FITC-VAD-FMK) promoveu valores de apoptose espermática (MARCHETTI, et al., 2004) e que a ativação da caspase pode ser induzida por agonistas específicos de apoptose, tais como o ácido betulimico (BA) (PAASCH et al., 2004; GRUNEWALD et al., 2005ab).

### 2.4.4. Translocação da fosfatidilserina

Durante as fases iniciais da permeabilização da membrana, sua assimetria ocorre antes da perda da integridade da membrana plasmática que é progressivamente danificada (MARTIN et al., 1995) . Em todos os tipos de células de mamíferos estudados, incluindo espermatozoides, os dois folhetos da bicamada de membrana plasmática diferem no teor de fosfolípidos. A Fosfatidilserina (PS) e fosfatidiletanolamina (PE) estão concentrados no folheto interno, enquanto esfingomielina (SM) e fosfatidilcolina (PC) estão concentrados na porção externa (GADELLA et al., 2000). Assim durante a apoptose, a membrana

plasmática torna-se pouco permeável e perde a assimetria em uma das primeiras etapas do processo. Quando a membrana da célula é perturbada o fosfolípido PS é translocado do folheto interno para o externo da membrana plasmática (DESAGHER e MARTINOU, 2000). Este sinal precoce de apoptose pode ser identificada pela ligação cálcio-dependente da anexina-V.

Anzar et al. (2002), utilizando a associação de anexina V-FITC e iodeto de propídio encontraram quatro diferentes sub-populações espermáticas. A Annexin V permite a identificação de células com integridade de membrana deteriorada numa fase mais precoce do que com uma sonda supravital (VERMES et al., 1995). Também segundo Glander e Schaller (1999) desde que haja fosfolípidos nas membranas lesadas, bem como sobre a superfície externa das células mortas, a sonda fluorescente supravital iodeto de propídio pode ser usado em combinação com a Annexina V. Este método permite a identificação de três diferentes tipos de espermatozoides: (i) espermatozoides viáveis (anexina V-negativos e iodeto de propídio, An-/PI-), espermatozoides em apoptose (anexina V positivo e iodeto de propídio negativo, An+/PI-), espermatozoides negativo (anexina V-positivas e iodeto de propídio-positivos, An-/PI+) e espermatozoides semi-mortos (Annexin V-positivas e iodeto de propídio positivo, An+/PI+).

### ***2.5. Análise por citometria de fluxo***

Uma série de características da célula espermática, como integridade das membranas plasmática e acrossomal, viabilidade e função celular podem ser avaliadas pela citometria de fluxo. Esta técnica possibilita a contagem, a classificação e o isolamento das células espermáticas que, após serem marcadas com uma sonda fluorescente específica, são individualmente movidas por meio de um sistema detector óptico em fluxo laminar para contagem (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009).

A descoberta de uma variedade de fluorocromos e compostos conjugados com sondas fluorescentes tornaram possível uma análise mais detalhada da qualidade do sêmen em níveis bioquímicos, ultraestruturais e funcionais. No entanto, apenas a análise microscópica de um pequeno número de espermatozoides dentro de uma população pode ser subjetiva e, geralmente, não contempla toda a população espermática. A adaptação destas avaliações para uso em citometria de fluxo com marcadores fluorescentes representa uma forma rigorosa e rápida para avaliar atributos de uma amostra seminal (GILLIAN et al., 2005).

Com a utilização da citometria de fluxo, é possível ainda a avaliação de múltiplos parâmetros em uma única amostra de sêmen. A associação de sondas fluorescentes vai

dependem do tipo de laser, dos detectores de radiação e dos filtros presentes no citômetro. Alguns citômetros podem possuir até 16 detectores de radiação dispersa e fluorescente, o que permite analisar múltiplas possibilidades de características celulares (RIESEBERG et al., 2001). Novas técnicas de associação de sondas fluorescentes são constantemente desenvolvidas para aplicação na citometria de fluxo visando à avaliação dos espermatozoides das mais diferentes espécies animais (GILLIAN et al., 2005).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS JM, CORY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, Washington, v.281, p.1322-1326, 1998.
- AGARWAL A, SAID TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Hum Reprod**, v.9, p.331-345, 2003.
- AMANN R, KATZ DF. Reflections on CASA after 25 years. **J Androl**, v.25, p.317-325, 2004
- ALTHOUSE GC, HOPKINS SM. Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. **Therio** v.43, p.595-603, 1995.
- ANZAR M, HE L, BUHR MM, KROETSCH TK, PAULS KP. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. **Biol Reprod** v.66, p.354-360, 2002.
- ARENDS MJ, W YLLIE AH. Apoptosis: mechanisms and role in pathology. **Int Rev Exp Pathol**, v.32, p.223-254, 1991.
- ARRUDA RP. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.
- ARRUDA RP, ANDRADE AFC, PERES KR, RAPHAEL CF, NASCIMENTO J, CELEGHINI ECC. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31(1), p.8-16, 2007.
- ARRUDA RP, CELEGHINI ECC, ALONSO MA, CARVALHO HF, OLIVEIRA LZ, NASCIMENTO J, SILVA DF, AFFONSO FJ, LEMES KM, JAIMES JD. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev Bras Reprod Anim**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.

- BARROSO G, VALDESPIN C, VEJA E, KERSHENOVICH R, AVILA R, AVENDANO C, OEHNINGER S. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. **Fertil steril** v.92, n.3, p.835-48, 2009.
- BRITO LFC. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. **C Tech Equi Pract**, v.6, p.249-264, 2007.
- BUSTAMANTE FILHO IC, SILVA JFS, JOBIM MIM. Apoptose em espermatozoides: uma nova abordagem na avaliação da viabilidade espermática. **Sem Ciên Agr**, v.26, n.3, p.395-404, 2005.
- CAMARA DR, GUERRA MMP, Mitochondria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP.). **Rev Bras Reprod Anim**, v.32, n.2, p.93-99, 2008.
- CONCANNON, C. G.; GORMAN, A. M.; SAMALLI, A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. **Apoptosis**, Netherlands, v.8, p.61-70, 2003.
- COSSON, J.A. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biol Int**, v.20, p.83-94, 1996.
- D'OCCHIO MJ, HENGSTBERGER KJ, JOHNSTON SD. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Anim Reprod Sci** v.101, p.1-17, 2007.
- DAVIS RO, SIEMERS ILI. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. **Reprod. Fertil. Develop.** v. 7, p.857-869, 1995.
- DESAGHER S, MARTINOUC JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol** v.10, p.369-377, 2000.
- DONNELLY ET, O'CONNELL M, MCCLURE N, LEWIS SE. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Hum Reprod**, v.15, p.1552-1561, 2000.
- ERIKSSON BM, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flat-pack s and maxi-straws. **Anim Reprod Sci** v.63, p.205-220, 2000.
- EVENSON DP, DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Scie**, v.210, p.1131, 1980.
- FERREIRA, J.C.P., NEVES NETO, J.R., PAPA, F.O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Rev Bras Reprod Anim**, v.21, p.131-132, 1997.

FREITAS-DELL'AQUA CP, CRESPILO AM, PAPA FO, DELL'AQUA JUNIOR JA. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Rev Bras Reprod Anim**, v.33, p.213-222, 2009.

GADELLA BM, HARRISON RAP. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. **Biol Reprod**, v.67, p.340-50, 2002.

GADELLA BM, MILLER NGA, COLENBRANDER B, VAN GOLDE LMG, HARRISON RAP. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. **Mol Reprod Dev** v.53, p.108-225, 2000.

GADELLA BM, HARRISON RAP. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. **Develop**, v. 127, p. 2407-20, 2000.

GARNER DL, JOHNSON LA, YUE ST, ROTH BL, HAUGLAND RP. Dual DNA staining assessment for bovine sperm viability using SYBR 14 and propidium iodide. **J Androl** v.15, p.620-629, 1994.

GARNER DL, PINKEL D, JOHNSON LA, PACE MM. Assessment of sperm membrane integrity using dual parameter flow cytometry. **In: Proceedings of the Society for Analytical Cytology, Anal Cytol X Program**, Abstract C 17, 1984

GARNER DL, PINKEL D, JOHNSON LA, PACE MM. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol Reprod** v.34, p.127-38, 1986.

GARNER DL, THOMAS CA, JOERG HW, DEJARNETTE JM, MARSHALL CE. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol Reprod** v.57, p.1401-1406, 1997.

GARNER DL, JOHNSON LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **Biol Reprod** v.53, p.276-284, 1995.

GILLAN L, EVANS G, MAXWELL WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Therio**, v.63, p.445-457, 2005.

GLANDER HJ, SCHALLER J. Binding of Annexin V to plasma membrane of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. **Mol Human Reprod** v.5, p.109-115, 1999.

- GRAHAM JK, KUNZE E AND HAMMERSTEDT RH Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biol Reprod**, v.43, p.55–64, 1990.
- GRAHAM EF, SCHMEHL MKL, NELSON DS. Problems with laboratory assays **Proc 8<sup>th</sup> tech ConfAI and reprod NAAB**, p. 1-8, 1980.
- GRAVANCE CG, GARNER DL, MILLER MG AND BERGER T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reprod Toxicol** v.15, p.5–10, 2001.
- GRUNEWALD S, PAASCH U, SAID TM, SHARMA RK, GLANDER HJ AND AGARWAL A. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. **Fertil Steril** v.83(Suppl 1),1106–1112, 2005<sup>a</sup>.
- GRUNEWALD S, PAASCH U, WUENDRICH K, GLANDER HJ. Sperm caspases become more activated in infertility patients than in healthy donors during Cryopreservation. **Arch of Androl**, v.51, p.449–460, 2005<sup>b</sup>.
- HARRISON RAP. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. **J. Reprod Fertil Suppl** v.52, p.195-211, 1997.
- HENKEL R, HAJIMOHAMMAD M, STALF T, HOOGENDIK C, MEHNERT C, MENKVELD R, GIPS H, SCHILL WB, KRUGER TF. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. **Fertil steril**, v.81, n.4, p.965-72, 2004.
- HOLT WV, MEDRANO A. Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. **J. Reprod Fertil Suppl** v.52, p.213-222, 1997.
- HONDA, A, SIRUNTAWINETI, J, BABA, T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. **H Reprod Upd** v. 8, p. 405-12, 2002.
- HUO LJ, MA XH, YANG ZM. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. **Therio** v.58, p.1349–60, 2002.
- JANUSKAUSKAS, A, JOHANNISSON, A, SODERQUIST, L, RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to the fertility of Swedish dairy AI bulls. **Therio**, v.53, p.859–75, 2000.
- KROEMER G, ZAMZAMI N, SUSIN SA. Mitochondrial control of apoptosis. **Immunol Tod**, v.18, p.44-51, 1997.
- LEE J, RICHBURG JH, YOUNKIN SC, BOEKELHEIDE K. The Fas system is a key regulator of germ cells apoptosis in the testis. **Endocrinol**, v.138, p.2081-2088, 1997.

LOVE CC, THOMPSON JA, BRINSKO SP, RIGBY SL, BLANCHARD TL, LOWRY VK, VARNER DD. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. **Therio**, v.60, p.1127-38, 2003.

LOVE CC: The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. **Anim Reprod Sci**, v.89, p.39-45, 2005.

MADRID-BURY N, PÉREZ-GUTIÉRREZ JP, PÉREZ-GARNELO S, MOREIRA P, SANJUANBENITO BP, GUTIÉRREZ-ADÁN A, MARTÍNEZ JF. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. **Therio**, v.64, p.232-241, 2005.

**Matos DL, Araújo AA, Roberto IG, Toniolli R.** Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.225-232, 2008.

MARCHETTI C, GALLEGO MA, DEFOSSEZ A, FORMSTECHEP P AND MARCHETTI P. Staining of human sperm with fluorochrome-labeled inhibitor of caspases to detect activated caspases: correlation with apoptosis and sperm parameters. **H Reprod**, v.19, p.1127–1134, 2004.

MARCHETTI C, MARCHETTI P. Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology. **Gynecol Obste Fertil**, v.33, p. 2005.

MARTIN SJ, REUTELINGSPERGER CP, MCGAHON AJ, RADER JA, VAN SCHIE RC, LAFACE DM, GREEN DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Experim Med**, v.182, p.1545–1556, 1995.

MORREL JM, JOHANNISSON A, DALIN AM, HAMMAR L, SANDEBERT T, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Vet Scand**, v.50, p.2, 2008.

NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E.K.; GADELLA, B.M. A triple- stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biol Reprod**, v. 68, p.1828-35, 2003.

PAASCH U, GRUNEWALD S, AGARWAL A, GLANDERA H. Activation pattern of caspase in human spermatozoa. **Fertil Steril**, v.81(1), p.802-809, 2004<sup>a</sup>



- PAASCH U, GRUNEWALD S, DATHE S AND GLANDER HJ. Mitochondria of human spermatozoa are preferentially susceptible to apoptosis. **Annals of New York Academy of Science**, v.1030, p.403–409, 2004<sup>b</sup>.
- PAASCH U, GRUNEWALD S, FITZL G AND GLANDER HJ. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. **J Androl**, v.24, p.246–252, 2003.
- PARKS JE, GRAHAM JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Therio** v. 38, p.209-222, 1992..
- RAMALHO-SANTOS, J, SCHATTEN, G, MORENO, RD. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. **Biol Reprod**, v. 67, p. 1043-51, 2002.
- RIESEBERG M, KASPER C, REARDON KF, SCHEPER T. Flow cytometry in biotechnology. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.56, p.350-260, 2001
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reprod Domest Anim**, v.38, p.312-318, 2003
- SAKKAS D, ALVAREZ JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis **Fertil Steril**, v.93 (4), p.1027-1036, 2010.
- SAID TM, PAASCH U, GLANDER HJ AND AGARWAL A. Role of caspases in male infertility. **H Reprod Upd** v.10, p.39–51, 2004.
- SAKKAS D, MANICARDI G, BIANCHI PG, BIZZARO D, BIANCHI U. Relationship between presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in mature and fertilizing mouse spermatozoa. **Biol Reprod**, v.52, p.1149-1155, 1995
- SANTOS, R. L. Morte celular por apoptose no testículo. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v. 23, p. 486-499, 1999.
- SILVA, PFN, GADELLA, BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Therio**, v.65, p.958-78, 2006.
- SIMÕES, R. **Influência da fragmentação de DNA espermático na produção in vitro de embriões bovinos**. 2010. 105f. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.
- SZASZ, F.; SIRIVAIDYAPONG, S.; CHENG, F.P.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; COLENBRANDER, B. Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. **Mol Reprod Develop**, v. 55, p.289-98, 2000.

THOMAS CA, GARNER DL, DEJARNETTE JM, MARSHALL CE. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol Reprod**, v.56, p.991-998, 1997.

VARNER DD. Developments in stallion semen evaluation **Therio** v.70, p.448-462, 2008.

VERMES I, HAANEN C, REUTELINGSPERGER CPM. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labelled annexin **Vet J Immunol Method**, v.180, 39–52 1995.

VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, OCLIN K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Therio**, v.57, p.149-179, 2002.

# Capítulo 2

**PAPER TRADUZIDO EM INGLÊS ENVIADO À REVISTA *JOURNAL EQUINE VETERINARY SCIENCE* – ISSN 0737-0806**

**Modificações das características morfofuncionais do sêmen equino mantido a temperatura ambiente**

Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua<sup>1</sup>, Gabriel Augusto Monteiro<sup>1</sup>, José Antonio Dell'Aqua Júnior<sup>1</sup>, Frederico Ozanam Papa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar as modificações ocorridas nas características morfofuncionais do sêmen equino estocado a temperatura ambiente (18-22°C) por um período de 12 horas. Assim, três ejaculados de seis diferentes garanhões foram avaliados quanto a cinética espermática através da análise computadorizada do movimento espermático, e integridades de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, índice de fragmentação de DNA, ativação de caspase e translocação de fosfolípidios de membrana através de microscopia de epifluorescência nos momentos 0, 3, 6 e 12h mantidos em temperatura ambiente (18-22°C). Após a avaliação da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, os dados foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de Tukey para determinar diferenças significativas nas variáveis entre grupos, com nível de significância  $p < 0,05$ , e realizada correlação de Pearson entre os parâmetros avaliados pelo CASA e por microscopia de fluorescência. Houve queda da qualidade espermática no decorrer do tempo, entre o período de 3 a 6 horas as alterações foram semelhantes a capacitação e após o período de 6 horas devido a exaustão celular as alterações foram semelhantes a apoptose.

Palavras-chave: garanhão, sêmen, apoptose, capacitação, metabolismo

**ABSTRACT**

The objective was to identify and assess the main characteristic and morphological functional changes in equine semen that is stored at room temperature (18-22°C) for a period of 12 hours. The sperm kinetics of three different ejaculates from six stallions were

evaluated using a computerized analysis of sperm motility. For morphological and functional assessments, the following parameters were evaluated: plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential, rate of DNA fragmentation, caspase activation and the translocation of membrane phospholipids based on epifluorescence microscopy. The assessments were performed at room temperature at 0, 3, 6 and 12 h.. For statistical analyses, the Kolmogorov-Smirnov test was used to test for normality. The data were subjected to analysis of variance followed by the Tukey test to determine significant differences in the variables between groups, with a significance level of  $p < 0.05$ . Pearson correlation between the parameters was evaluated based on CASA and fluorescence microscopy. There was a decrease in sperm quality over time; between 3 h and 6 h, the changes were similar to capacitation, and after 6 h, the cell changes were similar to apoptosis due to depletion of nutrients.

Keywords: stallion, semen, apoptosis, capacitation, metabolism

## INTRODUÇÃO

Existem diversas variáveis envolvidas na viabilidade e longevidade do sêmen, tais como: fatores físicos, morfológicos, bioquímicos e metabólicos inerentes à célula espermática. Esta é constituída de vários compartimentos, tais como membrana plasmática, membrana acrossomal e bainha mitocondrial e para o funcionamento normal da célula é necessário que estes compartimentos estejam com suas funções preservadas (1).

Convencionalmente, o principal teste para a qualidade do sêmen têm sido a estimativa da porcentagem de células móveis. Com a análise computadorizada do sêmen, pôde-se padronizar a motilidade espermática de cada espécie e obter maior objetividade e repetibilidade (2). Ferreira et al. (3) concluíram que o método de análise computadorizada mostrou-se prático, rápido e de fácil execução.

A avaliação da membrana plasmática é um indicador adequado para a viabilidade do espermatozóide uma vez que as membranas são extremamente suscetíveis a danos do meio externo (4,5). Sua integridade pode ser avaliada através de sondas fluorescentes supravitais que dependem da capacidade das membranas intactas de excluí-los do compartimento interno do espermatozóide (6,7,8). O acrossomo é derivado do complexo de Golgi sendo composto por enzimas hidrolíticas organizadas em um tipo de matriz (9). A ligação do espermatozóide com a zona pelúcida provocará a reação acrossômica resultando na liberação e ativação das enzimas acrossomais. Isto junto com a hiperativação da motilidade ajudará o espermatozóide a penetrar a zona pelúcida (10). Assim o acrossomo

deve permanecer intacto antes e durante trânsito pelo trato reprodutivo da fêmea até ocorrer a ligação com a zona pelúcida. Quando a reação acrossômica ocorre antes do previsto pode-se ter uma queda na fertilidade do sêmen (11).

Alterações semelhantes a apoptose também pode ocorrer no ejaculado de garanhões (12). De acordo com Camara et al. (13) os eventos apoptóticos têm início nas mitocôndrias e tendo em vista que não ocorre transcrição e translação nas células espermáticas, alternativas têm sido propostas para a ocorrência de apoptose neste gameta, como atividade de caspases (12,14) que culminam com a fragmentação de DNA (15,16). Também durante a apoptose a fosfatidilserina, normalmente presente no interior da membrana das células saudáveis, é translocada e exposta no exterior. Este distúrbio progressivamente pode levar a lesão de membrana (17).

Estas alterações resultam em uma diminuição da longevidade da célula espermática no trato reprodutivo da fêmea. Este fato é especialmente problemático em espécies como a equina, que apresenta um período de estro longo e que requer um cuidado maior na determinação da ovulação e da melhor hora para a inseminação (18). O objetivo deste trabalho foi avaliar as modificações ocorridas nas características espermáticas do ejaculado de garanhões no período de 0 à 12h após ejaculação em temperatura ambiente (18-22°C).

## MATERIAL E METODOS

Foram utilizados três ejaculados de seis diferentes garanhões em idade reprodutiva das raças mangalarga marchador, brasileiro de hipismo, quarto de milha, árabe e mestiço mangalarga. Os ejaculados foram colhidos através de vagina artificial. Após a colheita o mesmo era filtrado para a retirada do gel, acondicionados em tubos de centrífuga, mantidos em temperatura ambiente (18-22°C) e analisado às 0, 3, 6 e 12h após a colheita.

As análises da cinética espermática foram avaliadas através do HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12 (CASA), para mensuração da motilidade espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilínea (VCL) e porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP; acima de 80µm/s de VAP).

As análises de integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, índice de fragmentação de DNA (IFD) ativação de caspase e translocação de fosfolípidios de membrana foram efetuadas em microscópio de epifluorescência (Leica, Alemanha) ao aumento de 1000x. De cada amostra foram examinadas 200 células espermáticas.

Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial foi utilizado protocolo descrito por Nascimento et al (19). Através das associações de sondas fluorescentes iodeto de propídio (IP; 50 µg/mL; P-4170, Sigma-Aldrich) para integridade de membrana plasmática, a associação da sonda fluorescente FITC com a lecitina *Pisum sativum* (FITC-PSA; 100 µg/mL; L-0770, Sigma-Aldrich) para integridade de membrana acrossomal e JC-1 (76,5 µM; T3168, Molecular Probes). Para a análise as células foram classificadas em 8 categorias para contagem e em 3 categorias para análise, sendo elas integridade de membrana plasmática (IMP), integridade de membrana acrossomal (IMA) e alto potencial mitocondrial (APM).

Para a avaliação do índice de fragmentação de DNA (IFD) foi realizada o teste de *acridine Orange* (158550, Sigma-Aldrich) de acordo com Unanian (20). A amostra de sêmen foi lavada três vezes a 700 x g por 3 minutos em 2 mL de TALP. O pellet formado foi re-suspendido com TALP para uma concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Desta solução foi preparado um esfregaço e deixado secar em temperatura ambiente por 60 minutos. Então este esfregaço foi imerso em Solução Carnoy (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético) para fixação durante 12 horas. A lamina seca em temperatura ambiente era posteriormente coberta com 3 mL da solução de acridina Orange (10mL de solução de acridina Orange; 1µg/mL + 40mL de solução de ácido cítrico 0,1M + 2,5 mL de solução de fosfato dissódico 0,3M; pH = 2-3), ficando por 5 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. O esfregaço era lavado cuidadosamente em água destilada e antes de secar completamente coberto com lamínula.

A associação de FITC-VAD-FMK (G7462, Promega) foi utilizada como marcadora *in situ* de Casp+. O protocolo utilizado foi de acordo com o fabricante, assim em 1 mL de uma solução de PBS com  $1 \times 10^6$  espermatozoides foi adicionado 1 µL de FITC-VAD-FMK a 5mM, e então homogeneizado e incubado em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 20 minutos. Após a incubação esta solução foi lavada (200 x g/5min) e re-suspendida em PBS com a concentração inicial e então adicionado 5 µL de IP (50 µg/mL;P-4170, Sigma-Aldrich) e 2 µL de Hoechst 33342 (40 µg/mL; H-1399, Molecular Probes Inc), aguardando 5 minutos para a posterior leitura.

Para a avaliação da translocação de fosfolípidios de membrana foi utilizada o Kit anexina V-FITC Kit I de apoptose (556547; BD Bioscience Pharmingen) de acordo com as recomendações do laboratório. Assim, alíquotas de sêmen foram diluídas em solução tampão de anexina V (10 mM Hepes/NaOH – pH 7,4 – 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) a uma concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL, um volume de 100 µL (concentração

final de  $1 \times 10^5$ ) desta amostra foi colocado em um criotubo tipo eppendorf e então acrescido de 5  $\mu$ L de anexina V-FITC, 5  $\mu$ L de IP (50  $\mu$ g/mL) e 2  $\mu$ L de Hoechst 33342 (40  $\mu$ g/mL; H-1399, molecular Probes Inc), homogeneizada e incubada por 15 minutos.

Para a análise estatística utilizou-se o programa SAS, após a avaliação da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey para determinar diferenças significativas em todos as variáveis entre grupos, com nível de significância  $p < 0,05$ . Também realizou-se as correlações entre os parâmetros avaliados pelo CASA e por microscopia de fluorescência através do teste de correlação de Pearson.

## RESULTADOS

Os dados da cinética espermática estão apresentados na tabela 1, onde pode-se observar que ocorreu diferença entre todos tempos estudados para os parâmetros de MT, MP, RAP e VSL. A velocidade VAP só mostrou queda significativa às 6h enquanto a VCL apenas às 12h de avaliação.

Tabela 1 - Média e desvio padrão das características do movimento espermático obtidos após análise computadorizada do sêmen *in natura* mantidos em temperatura ambiente (18-22°C) nos momentos 0 hora, 3 horas, 6 horas e 12 horas, após colheita do ejaculado de seis garanhões.

|                                     | 0h                            | 3h                             | 6h                           | 12h                          |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Motilidade Total (%)                | 77,7 $\pm$ 7,7 <sup>a</sup>   | 63,5 $\pm$ 14,3 <sup>b</sup>   | 39,3 $\pm$ 16,1 <sup>c</sup> | 4,8 $\pm$ 5,8 <sup>d</sup>   |
| Motilidade Progressiva (%)          | 31,5 $\pm$ 5,1 <sup>a</sup>   | 17,8 $\pm$ 6,2 <sup>b</sup>    | 9,3 $\pm$ 5,1 <sup>c</sup>   | 1,2 $\pm$ 1,4 <sup>d</sup>   |
| Espermatozóides rápidos (%)         | 62,4 $\pm$ 12,5 <sup>a</sup>  | 46,3 $\pm$ 16,9 <sup>b</sup>   | 25,8 $\pm$ 14,2 <sup>c</sup> | 1,9 $\pm$ 3 <sup>d</sup>     |
| Velocidade de trajeto ( $\mu$ m/s)  | 120,4 $\pm$ 16,3 <sup>a</sup> | 110,9 $\pm$ 23,4 <sup>ab</sup> | 94,9 $\pm$ 24,1 <sup>b</sup> | 76,5 $\pm$ 18,1 <sup>c</sup> |
| Velocidade de linear ( $\mu$ m/s)   | 91,4 $\pm$ 9,9 <sup>a</sup>   | 77,4 $\pm$ 13,9 <sup>b</sup>   | 66,1 $\pm$ 13,2 <sup>c</sup> | 54,9 $\pm$ 10,5 <sup>d</sup> |
| Velocidade curvilinear ( $\mu$ m/s) | 207,2 $\pm$ 32,1 <sup>a</sup> | 202,2 $\pm$ 37,7 <sup>a</sup>  | 179,2 $\pm$ 44 <sup>a</sup>  | 141,3 $\pm$ 40 <sup>b</sup>  |

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si,  $p < 0,05$

Quanto à análise por microscopia de epifluorescência os dados são apresentados na tabela 2. A IMP diferiu em todos os momentos avaliados. Os parâmetros de IMA e APM apresentaram diminuição significativa as 6 e 12h. O IFD apresentou aumento significativo dos valores às 6h em relação à 0h. A porcentagem de células viáveis sem ativação de caspases diminuiu às 3h em relação à 0h, enquanto que a porcentagem de células viáveis sem translocação de fosfolipídios de membrana diminuiu apenas a partir das 6h.



Tabela 2 - Média e desvio padrão das características espermáticas obtidas após análise por microscopia de epifluorescência do sêmen *in natura* mantidos em temperatura ambiente (18-22°C) nos momentos 0 hora, 3 horas, 6 horas e 12 horas, após colheita do ejaculado de seis garanhões.

|   | 0h                       | 3h                       | 6h                       | 12h                      |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Integridade de membrana plasmática (%)                          | 47,7 ± 10,4 <sup>a</sup> | 37,6 ± 8,9 <sup>b</sup>  | 26,4 ± 9,8 <sup>c</sup>  | 2,7 ± 3,7 <sup>d</sup>   |
| Integridade de membrana acrossomal (%)                          | 75,7 ± 5,8 <sup>a</sup>  | 70,3 ± 5,8 <sup>a</sup>  | 60,6 ± 7,6 <sup>b</sup>  | 40,2 ± 10,2 <sup>c</sup> |
| Alto potencial mitocondrial (%)                                 | 55,1 ± 13,1 <sup>a</sup> | 48,8 ± 12,8 <sup>a</sup> | 35,4 ± 13,3 <sup>b</sup> | 8,4 ± 9,2 <sup>c</sup>   |
| Índice de fragmentação de DNA (%)                               | 6,5 ± 3,1 <sup>b</sup>   | 10,6 ± 5,2 <sup>ab</sup> | 11,8 ± 4,5 <sup>a</sup>  | 14 ± 5,5 <sup>a</sup>    |
| Células viáveis sem caspase ativada (%)                         | 28,8 ± 10,6 <sup>a</sup> | 21,3 ± 9,7 <sup>b</sup>  | 14,7 ± 8,3 <sup>b</sup>  | 0,6 ± 1,2 <sup>c</sup>   |
| Células viáveis com caspase ativada (%)                         | 15,9 ± 5,1 <sup>a</sup>  | 15,5 ± 5,1 <sup>a</sup>  | 12,5 ± 4,3 <sup>a</sup>  | 1,4 ± 2 <sup>b</sup>     |
| Células viáveis sem translocação de fosfolípido de membrana (%) | 24,3 ± 10,4 <sup>a</sup> | 19,8 ± 8,6 <sup>ab</sup> | 14,8 ± 8,8 <sup>b</sup>  | 0,8 ± 1,3 <sup>c</sup>   |
| Células viáveis com translocação de fosfolípido de membrana (%) | 17,4 ± 6,7 <sup>a</sup>  | 17,3 ± 5,8 <sup>a</sup>  | 14,1 ± 4,5 <sup>a</sup>  | 1,5 ± 2,1 <sup>b</sup>   |

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si,  $p < 0,05$

As tabelas 3, 4 e 5 indicam os valores de correlação de Pearson para todas as avaliações realizadas (todos em relação a todos) nos momentos 0h, 3h e 6h, respectivamente. Os parâmetros CASA de MT e RAP apresentaram alta correlação entre si nos três momentos avaliados, e apresentaram alta correlação com as velocidades (VAP, VSL e VCL) nos momentos 0 e 3h. A MP apresentou alta correlação com MT e RAP às 3h e com as velocidades às 6h. Em relação as velocidades elas apresentaram sempre alta correlação entre si, em todos os momentos avaliados. Na correlação das avaliações morfofuncionais com os parâmetros CASA, apenas o IDF apresentou alta correlação negativa com MT, RAP e VCL às 0h e a CVSTPS correlação positiva com MT e RAP às 6h. Entre as avaliações morfofuncionais, o IDF apresentou correlação negativa com IMP e APM às 0h. Às 3h e às 6h CVSTPS teve correlação positiva com IMP, APM e CVSCA.

Tabela 3 – Correlações entre as características do movimento espermático e da análise morfofuncional do sêmen *in natura* às 0h.

|        | MT                              | MP               | RAP              | VAP              | VSL              | VCL              | IMP              | APM              | IMA              | IDF              | CVSC             | CVCC             | CVSTP<br>S       |
|--------|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| MP     | Coefficiente de correlação<br>p | 0,581<br>0,0115  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| RAP    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,607<br>0,0075  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| VAP    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,536<br>0,0219  | 0,930<br><0,0001 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| VSL    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,746<br>0,0004  | 0,855<br><0,0001 | 0,943<br><0,0001 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| VCL    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,803<br>0,0001  | 0,869<br><0,0001 | 0,905<br><0,0001 | 0,743<br>0,0004  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| IMP    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,653<br>0,0033  | 0,675<br>0,0021  | 0,547<br>0,0188  | 0,509<br>0,0309  | 0,582<br>0,0113  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| APM    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,652<br>0,0034  | 0,682<br>0,0018  | 0,594<br>0,0093  | 0,529<br>0,0240  | 0,663<br>0,0027  | 0,898<br><0,0001 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| IMA    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,196<br>0,4359  | 0,116<br>0,6475  | 0,038<br>0,8817  | 0,014<br>0,9553  | 0,205<br>0,4145  | 0,513<br>0,0296  | 0,517<br>0,0281  |                  |                  |                  |                  |                  |
| IDF    | Coefficiente de correlação<br>p | -0,761<br>0,0002 | -0,773<br>0,0002 | -0,636<br>0,0046 | -0,542<br>0,0201 | -0,745<br>0,0004 | -0,748<br>0,0004 | -0,724<br>0,0007 | -0,327<br>0,1853 |                  |                  |                  |                  |
| CVSC   | Coefficiente de correlação<br>p | 0,526<br>0,0248  | 0,550<br>0,0180  | 0,517<br>0,0281  | 0,441<br>0,0671  | 0,540<br>0,0206  | 0,686<br>0,0017  | 0,699<br>0,0013  | 0,267<br>0,2840  | -0,570<br>0,0134 |                  |                  |                  |
| CVCC   | Coefficiente de correlação<br>p | -0,508<br>0,0314 | -0,133<br>0,5978 | -0,431<br>0,0741 | -0,164<br>0,5149 | -0,344<br>0,1617 | -0,327<br>0,1856 | -0,330<br>0,1810 | -0,073<br>0,7728 | 0,531<br>0,0234  | -0,452<br>0,0596 |                  |                  |
| CVSTPS | Coefficiente de correlação<br>p | 0,453<br>0,0592  | 0,313<br>0,2054  | 0,449<br>0,0617  | 0,284<br>0,2529  | 0,292<br>0,2389  | 0,677<br>0,0020  | 0,634<br>0,0047  | 0,296<br>0,2338  | -0,531<br>0,0233 | 0,755<br>0,0003  | -0,305<br>0,2192 |                  |
| CVCTPS | Coefficiente de correlação<br>p | -0,146<br>0,5633 | 0,155<br>0,5397  | -0,122<br>0,6287 | 0,009<br>0,9723  | -0,062<br>0,8082 | 0,140<br>0,5787  | 0,194<br>0,4402  | 0,350<br>0,1547  | -0,036<br>0,8866 | 0,065<br>0,7989  | 0,188<br>0,4555  | -0,279<br>0,2631 |

Coeficiente de correlação de Pearson.

Tabela 4 – Correlações entre as características do movimento espermático e da análise morfofuncional do sêmen *in natura* às 3h.

|        | MP                              | RAP              | VAP              | VSL              | VCL              | IMP              | IMA              | APM              | IDF              | CVSC             | CVCC             | CVSTPS           |
|--------|---------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| MP     | Coefficiente de correlação<br>p | 0,865<br><0,0001 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| RAP    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,965<br><0,0001 | 0,867<br><0,0001 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| VAP    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,690<br>0,0015  | 0,610<br>0,0072  | 0,780<br>0,0001  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| VSL    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,753<br>0,0003  | 0,766<br>0,0002  | 0,834<br><0,0001 | 0,954<br><0,0001 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| VCL    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,735<br>0,0005  | 0,612<br>0,0070  | 0,831<br><0,0001 | 0,959<br><0,0001 | 0,932<br><0,0001 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
| IMP    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,611<br>0,0071  | 0,622<br>0,0059  | 0,617<br>0,0064  | 0,284<br>0,2526  | 0,372<br>0,1284  | 0,344<br>0,1621  |                  |                  |                  |                  |                  |
| APM    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,338<br>0,1699  | 0,261<br>0,2952  | 0,379<br>0,1213  | 0,225<br>0,3700  | 0,186<br>0,4590  | 0,256<br>0,3060  | 0,462<br>0,0538  |                  |                  |                  |                  |
| IMA    | Coefficiente de correlação<br>p | 0,435<br>0,0709  | 0,602<br>0,0081  | 0,378<br>0,1225  | 0,044<br>0,8636  | 0,222<br>0,3752  | 0,094<br>0,7120  | 0,805<br>0,0001  | 0,310<br>0,2101  |                  |                  |                  |
| IDF    | Coefficiente de correlação<br>p | -0,494<br>0,0372 | -0,583<br>0,0111 | -0,538<br>0,0212 | -0,154<br>0,5421 | -0,242<br>0,3339 | -0,206<br>0,4118 | -0,685<br>0,0017 | -0,532<br>0,0231 |                  |                  |                  |
| CVSC   | Coefficiente de correlação<br>p | 0,361<br>0,1410  | 0,571<br>0,0134  | 0,353<br>0,1513  | 0,107<br>0,6723  | 0,276<br>0,2679  | 0,118<br>0,6404  | 0,604<br>0,0080  | 0,680<br>0,0019  | -0,442<br>0,0666 |                  |                  |
| CVCC   | Coefficiente de correlação<br>p | -0,477<br>0,0452 | -0,645<br>0,0038 | -0,518<br>0,0278 | -0,382<br>0,1179 | -0,442<br>0,0662 | -0,276<br>0,2673 | -0,252<br>0,3124 | -0,115<br>0,6501 | -0,345<br>0,1609 |                  |                  |
| CVSTPS | Coefficiente de correlação<br>p | 0,601<br>0,0083  | 0,686<br>0,0017  | 0,543<br>0,0199  | 0,202<br>0,4222  | 0,333<br>0,1772  | 0,181<br>0,4721  | 0,745<br>0,0004  | 0,787<br>0,0001  | 0,510<br>0,0306  | -0,351<br>0,1536 |                  |
| CVCTPS | Coefficiente de correlação<br>p | -0,255<br>0,3075 | -0,390<br>0,1091 | -0,209<br>0,4049 | -0,074<br>0,7705 | -0,132<br>0,6028 | 0,083<br>0,7424  | -0,333<br>0,1765 | -0,279<br>0,2620 | -0,302<br>0,2240 | 0,523<br>0,0261  | -0,518<br>0,0277 |

Coeficiente de correlação de Pearson.

Tabela 5 – Correlações entre as características do movimento espermático e da análise morfofuncional do sêmen *in natura* às 6h

|                            | MP      | RAP     | VAP     | VSL     | VCL    | IMP     | IMA    | APM    | IDF    | CVSC    | CVCC   | CVSTPS |
|----------------------------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| Coefficiente de correlação | 0,878   |         |         |         |        |         |        |        |        |         |        |        |
| p                          | <0,0001 |         |         |         |        |         |        |        |        |         |        |        |
| Coefficiente de correlação | 0,932   | 0,927   |         |         |        |         |        |        |        |         |        |        |
| p                          | <0,0001 | <0,0001 |         |         |        |         |        |        |        |         |        |        |
| Coefficiente de correlação | 0,488   | 0,740   | 0,607   |         |        |         |        |        |        |         |        |        |
| p                          | 0,0401  | 0,0004  | 0,0075  |         |        |         |        |        |        |         |        |        |
| Coefficiente de correlação | 0,396   | 0,708   | 0,540   | 0,952   |        |         |        |        |        |         |        |        |
| p                          | 0,1036  | 0,0010  | 0,0208  | <0,0001 |        |         |        |        |        |         |        |        |
| Coefficiente de correlação | 0,613   | 0,820   | 0,977   | 0,892   |        |         |        |        |        |         |        |        |
| p                          | 0,0068  | <0,0001 | <0,0001 | <0,0001 |        |         |        |        |        |         |        |        |
| Coefficiente de correlação | 0,655   | 0,540   | 0,042   | 0,113   | 0,132  |         |        |        |        |         |        |        |
| p                          | 0,0032  | 0,0206  | 0,8677  | 0,6563  | 0,6028 |         |        |        |        |         |        |        |
| Coefficiente de correlação | 0,144   | 0,322   | 0,336   | 0,342   | 0,349  | 0,327   |        |        |        |         |        |        |
| p                          | 0,5690  | 0,1919  | 0,4036  | 0,1643  | 0,1557 | 0,1852  |        |        |        |         |        |        |
| Coefficiente de correlação | 0,730   | 0,677   | 0,691   | 0,276   | 0,364  | 0,832   | 0,307  |        |        |         |        |        |
| p                          | 0,0006  | 0,0020  | 0,0015  | 0,2677  | 0,1374 | <0,0001 | 0,2155 |        |        |         |        |        |
| Coefficiente de correlação | -0,304  | -0,286  | 0,158   | 0,042   | 0,095  | -0,689  | -0,003 | -0,581 |        |         |        |        |
| p                          | 0,2200  | 0,2491  | 0,1665  | 0,8700  | 0,7087 | 0,0015  | 0,9920 | 0,0115 |        |         |        |        |
| Coefficiente de correlação | 0,636   | 0,432   | 0,599   | -0,083  | 0,112  | 0,685   | 0,183  | 0,653  | -0,480 |         |        |        |
| p                          | 0,0045  | 0,0733  | 0,0086  | 0,7444  | 0,6572 | 0,0017  | 0,4666 | 0,0033 | 0,0440 |         |        |        |
| Coefficiente de correlação | 0,039   | -0,006  | 0,045   | 0,083   | 0,279  | -0,459  | 0,021  | -0,350 | 0,525  | -0,308  |        |        |
| p                          | 0,8779  | 0,9805  | 0,8578  | 0,7446  | 0,2616 | 0,0554  | 0,9332 | 0,1546 | 0,0252 | 0,2144  |        |        |
| Coefficiente de correlação | 0,764   | 0,607   | 0,705   | 0,136   | 0,241  | 0,756   | 0,080  | 0,707  | -0,654 | 0,864   | -0,366 |        |
| p                          | 0,0002  | 0,0075  | 0,0011  | 0,5903  | 0,3344 | 0,0003  | 0,7537 | 0,0010 | 0,0032 | <0,0001 | 0,1352 |        |
| Coefficiente de correlação | -0,155  | -0,083  | -0,118  | 0,011   | 0,111  | -0,075  | 0,235  | 0,240  | 0,139  | -0,110  | 0,238  | -0,300 |
| p                          | 0,5391  | 0,7441  | 0,6407  | 0,9651  | 0,6617 | 0,7670  | 0,3474 | 0,3377 | 0,5816 | 0,6645  | 0,3420 | 0,2265 |

Coeficiente de correlação de Pearson.

## DISCUSSÃO

De acordo com os resultados houve diminuição da cinética espermática no decorrer do tempo de acordo com os parâmetros de MT, MP e RAP. Sabe-se que para que haja motilidade espermática é necessária a produção de energia pela célula espermática. A função fisiológica das mitocôndrias nas células é realizar a fosforilação oxidativa e produzir ATP como fonte de energia metabólica (21). Segundo Mortimer (22) a posição das mitocôndrias ao redor da porção proximal do axonema sugere que elas são necessárias para a produção de ATP usado na motilidade flagelar, mas em nosso trabalho, ocorreu queda significativa das motilidades totais e progressiva já após as 3 horas, enquanto que a queda do potencial mitocondrial ocorreu apenas às 6h. Assim, aparentemente a glicólise ocorre ao longo de todo o comprimento da peça principal e esta, e não só a fosforilação oxidativa na peça intermediária é a fonte de ATP para a cauda (23,24,25).

Sustentando esta hipótese, foi demonstrado que os espermatozoides de mamíferos produzem lactato a partir da glicose em condições aeróbicas (26) e que a produção de ATP através da glicólise é necessária para a hiperativação da motilidade espermática (27); e a inibição da fosforilação oxidativa não bloqueia a fertilização (28,29). Portanto, segundo Turner (29), a glicólise na peça principal, e não necessariamente a fosforilação oxidativa na peça intermediária, é necessária para uma motilidade flagelar normal nos mamíferos.

A integridade da membrana plasmática também apresentou queda significativa dos valores, já que sua manutenção também é dependente do metabolismo espermático e, de acordo com a fisiologia celular, com a queda na produção de ATP há desequilíbrio da homeostase celular levando a ruptura da membrana plasmática isto porque, as bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dependem de ATP para o seu funcionamento (30). Além disso a IMP apresentou alta correlação positiva com as CVSTPS às 3h ( $r=0,741$ ) e às 6h ( $r=0,756$ ) o que representa que a diminuição do metabolismo celular pela queda da produção de ATP levam a lesões semelhantes a apoptose ou capacitação espermática.

Outro dado que deve ser ressaltado da cinética espermática é o fato de apenas ter ocorrido queda às 3h apenas para VSL enquanto que para a VAP e a VCL esta diferença ocorreu às 6h e isso pode ser explicado, pois os dados das velocidades são gerados apenas pelas células móveis e não pela população total. Assim apesar da queda das motilidades não houve redução das velocidades. Outro ponto importante é a relação entre as velocidades VSL e VCL. Como houve queda da VSL e da MP, que estão relacionadas com o desgaste metabólico das células (22), mas a VCL se manteve com altos valores,

caracterizando um padrão de cinética espermática semelhante a hiperativação, observado já no momento 3h. Como a VCL é a distância percorrida total pela célula e a VSL é a distância linear (de um ponto a outro) quanto maior a diferença entre elas maior foi o percurso total percorrido, mas menor foi o deslocamento real da célula, caracterizando um movimento de hiperativação (22,31).

Esse movimento característico da hiperativação também pode ser justificado pelos valores de APM, que só diminuíram a partir de 6h, isso porque a hiperativação apresenta um aumento do metabolismo espermático com alta atividade glicolítica e consumo de O<sub>2</sub> (32), além disso, de acordo com a literatura durante a capacitação também aumenta a fluidez da membrana, pois os lipídeos mudam de posição, da face externa para a interna da bicamada lipídica (33,34,35,36) evidenciado pela queda da porcentagem de células viáveis sem translocação de fosfolipídios de membrana às 6h e a manutenção da porcentagem de células viáveis com translocação de fosfolipídios até as 6h, associado a alta correlação encontrada entre estes dois parâmetros (AMP e CVSTPS) às 3 ( $r=0,787$ ) e às 6h ( $r=0,707$ ) de membrana mostram que entre o período de 3 a 6 horas as modificações ocorridas no sêmen foram semelhantes a capacitação.

A integridade da membrana acrossomal teve queda significativa no momento 6 horas, podendo ser justificada devido aos fatores de capacitação, já que a reação acrossomal é o evento seguinte a capacitação (32). A reação acrossômica é um processo irreversível e é essencial para a fertilização, pois este processo envolve a fusão e a formação de uma vesícula da membrana do acrossoma com a membrana plasmática da célula espermática, o que permite a liberação de suas enzimas hidrolíticas e, portanto só deve ocorrer após a ligação do espermatozóide com a zona pelúcida.

Depois deste período, associado aos dados de fragmentação de DNA que aumentou a partir das 6h, das células viáveis sem ativação de caspases que diminuiu às 3h e da manutenção das células viáveis com caspases ativadas as alterações encontradas foram semelhantes a apoptose. Pois de acordo com Kroemer et al. (37) a seqüência normal de eventos que determinam a apoptose é a diminuição do potencial de membrana mitocondrial precedido pela fragmentação do DNA nuclear, a produção de espécies reativas ao oxigênio e, finalmente, o aumento na permeabilidade da membrana, o que foi observado neste trabalho que com a diminuição das células com alto potencial mitocondrial ocorreu aumento da fragmentação de DNA e diminuição das células viáveis sem marcadores de apoptose (ativação de caspases e translocação de fosfolipídio de membrana). A

translocação de fosfolipídios de membrana pode ocorrer nos dois processos sugeridos neste trabalho, tanto pode ser um processo de capacitação quanto de apoptose.

Como o sêmen neste trabalho foi mantido no plasma seminal e em temperatura ambiente (18-22°C) seu metabolismo foi diminuído a quase 25% pois de acordo Squires et al (38) a cada diminuição de 10°C o metabolismo reduz em 50% e sabendo-se que o metabolismo espermático é exógeno, ou seja, através de substratos (glicose e frutose) que são transportados para dentro das células (39), e como as células espermáticas, não apresentam enzimas para atuar na via das pentoses, nem para o metabolismo do glicogênio (40), podemos concluir que mesmo com a queda do metabolismo espermático houve alterações semelhantes a capacitação no período de 3 a 6 horas e com a diminuição dos substratos encontrados no plasma seminal, iniciou um processo de exaustão celular culminado alterações semelhantes a apoptose demonstradas pela queda da atividade espermática seguido de morte celular.

#### CONCLUSÃO

Espermatozoides eqüinos mantidos *in vitro* na temperatura ambiente apresentam uma queda progressiva do percentual de células móveis e entre 3 e 6 horas de estocagem demonstrando alterações semelhantes a capacitação e posteriormente diminuição dos parâmetros resultando em falência metabólica e acentuada morte celular.

#### REFERÊNCIAS

- 1.Graham EF, Schmehl MKL, Nelson DS. Problems with laboratory assays. In: NATIONAL ASSOCIATION OF ANIMAL BREEDERS TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION. 8., 1980, Columbia. **Proceedings... Columbia: National Association of Animal Breeders**, 1980. p. 59-66.
- 2.Davis RO, Siemers ILI. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. **Reprod. Fertil. Develop.** v. 7, p.857-869, 1995.
- 3.Ferreira JCP, Neves Neto JR, Papa FO. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Rev Bras Reprod Anim**, v.21, p.131-132, 1997.
- 4.Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.
- 5.Holt WV, Medrano, A. Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 52, p. 213-222, 1997.

6. Althouse GC, Hopkins SM. Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. **Theriogenology**, v.43, p.595-603, 1995.
7. Graham JK, Kunze E and Hammerstedt RH Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biol Reprod**, v.43, p.55-64, 1990.
8. Gravance CG, Garner DL, Miller MG and Berger T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reprod Toxicol** v.15, p.5-10, 2001.
9. Ramalho-Santos, J, Schatten, G, Moreno, RD. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. **Biol Reprod**, v. 67, p. 1043-51, 2002.
10. Honda A, Siruntawineti J, Baba T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. **Human Reproduction Update** v. 8, p. 405-12, 2002
11. Silva PFN, Gadella, BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-78, 2006.
12. Marchetti C, Marchetti P. Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology. **Gynecology Obstetrics Fertility**, v.33, p. 2005.
13. Camara DR, Guerra MMP, Mitochondria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Rev Bras Reprod Anim**, v.32, n.2, p.93-99, 2008.
14. Said TM, Paasch U, Glander HJ and Agarwal A. Role of caspases in male infertility. **Human Reprod Update** v.10, p.39-51, 2004.
15. Sakkas D, Manicardi G, Bianchi PG, Bizzaro D, Bianchi U. Relationship between presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in mature and fertilizing mouse spermatozoa. **Biol Reprod**, v.52, p.1149-1155, 1995
16. Love CC: The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. **Anim Reprod Sci**, v.89, p.39-45, 2005.
17. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J Experim Med**, v.182, p.1545-1556, 1995.
18. Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Galan Y, Varela-Fernandez E, Gallardo-Bolanos JM, Muriel A, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, Pena FJ. Detection of “Apoptosis-Like” changes during cryopreservation process in equine sperm. **Journal of Andrology**, v. 29, p.213-221, 2008.



19. Nascimento J, Raphael CF, Andrade AFC, Alonso MA, Celeghini ECC, Arruda RP. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **J Equine Vet Sci**, v.28, p.351-358, 2008.
20. Unanian, MM. Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. Brasília: **Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia**, 2000. 21p (Embrapa recursos genéticos e biotecnologia. Documentos 56)
21. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. **Trends in Biochemical Science**, v. 25, n. 7, p. 319-324, 2000.
22. Mortimer ST. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.
23. Westhoff D, Kamp G. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Journal of Cell Science**, v. 110, n. 15, p. 1821-1829, 1997.
24. Bunch DO, Welch JE, Magyar PL, Eddy AM, O'Brien DA. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-S protein distribution during mouse spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 3, p. 834-841, 1998
25. Travis AJ, Foster JÁ, Rosenbaum NA, Visvonti PE, Gerton GL, Kopf GS, Moss SB. Targeting of a gem cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, n. 2, p. 263-276, 1998.
26. Storey BT, Kayne FJ. Energy metabolism of spermatozoa. V. The Embden-Myerhof pathway of glycolysis: activities of pathways enzymes in hypotonically treated rabbit epididymal spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 26, n. 12, p. 1257-1265, 1975.
27. Urner F, Sakkas, D. Glucose participates in sperm-oocyte fusion in the mouse. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 4, p. 917-922, 1996.
28. Miki K, Qu W, Goulding EH, Willis WD, Bunch DO, Strader LF, Perreaul SD, Eddy EM, O'Brien DA. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 101, n. 47, p. 16501-16506, 2004.
29. Turner, RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction Fertility and Development**, v.18, n. 2, p. 25-38, 2006.
30. Guyton AC, Hall JE. A célula e seu funcionamento. In: **Tratado de fisiologia médica**, 9a. edição, ed. Guanabara Koogan, 1996.

31. Versteegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.
32. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. *In*: Knobil, E.; Neill, J. (Eds), **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p.189-317.
33. Harrison RAP, Gadella BM., 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. **Theriogenology**, **63**, 342–351
34. Gadella BM., Sperm membrane physiology and relevance for fertilization, *Anim. Reprod. Sci.* (2008), doi:[10.1016/j.anireprosci.2008.05.006](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.05.006)
35. Gadella BM, Tsai PS, Boerkke A, Brewis IA. Sperm head membrane reorganisation during capacitation *Int. J. Dev. Biol.* 52: 473-480 (2008) doi: [10.1387/ijdb.082583bg](https://doi.org/10.1387/ijdb.082583bg)
36. Hickey KD, Buhr MM. Lipid bilayer composition affects transmembrane protein orientation and function *J Lipids*. 2011;2011:208457. Epub 2011 Jan 26.
37. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. **Immunol Today**, v.18, p.44-51, 1997
38. Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer, JE. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999 p.1-38. (Bulletin, 9).
39. Vasconcelos AB. Bioquímica do sêmen. *Ver. Bras. Reprod Anim Supl*, n.6, p.32-35, 2009.
40. Inskeep PB, Hammerstedt RH. A colorimetric method to assess endogenous metabolism and its application to the study of bovine sperm. **J Biochem Biophys Methods**, v.7, p.199-210, 1983.

# Capítulo 3

**PAPER ENVIADO À REVISTA *VETERINÁRIA E ZOOTECNIA* – ISSN 0102-5716****Modulação das características morfofuncionais do sêmen equino através de dois sistemas de refrigeração passiva**

Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua<sup>1</sup>, Gabriel Augusto Monteiro<sup>1</sup>, José Antonio Dell'Aqua Júnior<sup>1</sup>, Frederico Ozanam Papa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

**RESUMO**

O objetivo foi verificar a possibilidade de modular estas alterações através de duas temperaturas de refrigeração (5°C e 15°C), utilizaram-se três ejaculados de seis diferentes garanhões, alíquotados em duas frações, uma para refrigeração à 5°C e outra à 15°C e avaliados nos momentos 0h, 12h e 24h. Após a avaliação da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, os dados foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de Tukey, com nível de significância  $p < 0,05$ . De acordo com os resultados ocorreu falência metabólica principalmente no período de 24h, sendo mais acentuada à temperatura de 15°C, já para a temperatura de 5°C apenas os parâmetros de potencial de membrana mitocondrial e ativação de caspase foi inferir ao sêmen fresco; para o período de 12h não houve queda significativa em ambas as temperaturas. Portanto, as amostras seminais foram melhores preservadas à 5°C do que à 15°C pelo período de 24h e por 12 horas a temperatura não há influência da temperatura.

Palavras-chave: Sêmen, garanhão, refrigeração, metabolismo espermática, análise seminal

**RESUMEN**

El objetivo fue verificar la posibilidad de adaptar estos cambios a través de dos temperaturas de refrigeración (5°C y 15°C), se utilizaron tres eyaculados de seis sementales distintos, alícuotas en dos fracciones, una para la refrigeración a 5°C y una vez a los 15°C y evaluados a 0h, 12h y 24h. Después de la evaluación de la normalidad de Kolmogorov-Smirnov, los datos fueron sometidos a análisis de varianza seguido por la prueba de Tukey, con nivel de significación de  $p < 0,05$ . De acuerdo con los resultados se produjo metabólica bancarrota en especial durante las 24 horas, siendo más pronunciada a una temperatura de 15°C, mientras que para la temperatura de 5°C sólo los parámetros del potencial de membrana mitocondrial y la activación de la caspasa se infiere que el semen fresco, para el período 12h no hubo disminución significativa en las temperaturas. Por lo

tanto, las muestras de semen se conservan mejor a los 5°C que a 15°C por un período de 24 horas y 12 horas la temperatura no influye en la temperatura. Palabras clave: Semen, semental, de refrigeración, el metabolismo, el esperma, el análisis de semen

#### **ABSTRACT**

In experiment 2, the objective was to determine the possibility of modulating these changes using two refrigeration temperatures (5°C and 15°C). Each ejaculate was aliquoted into two equal fractions, one of which was cooled to 5°C and the other cooled to 15°C; these fractions were evaluated at 0, 12 and 24 h after cooling. For statistical analyses, the Kolmogorov-Smirnov test was used to test for normality. The data were subjected to analysis of variance followed by the Tukey test to determine significant differences in the variables between groups, with a significance level of  $p < 0.05$ . The results suggest that metabolic resources became completely depleted, especially after 24 h. This was most pronounced at a temperature of 15°C, whereas for the temperature of 5°C, only the mitochondrial membrane potential and caspase activation parameters differed from those of fresh semen. After 12 h, there were no significant changes for either temperature. Therefore, semen samples were preserved better at 5°C than at 15°C over 24 h, whereas there was no influence of temperature over 12 h. Palabras clave: Semen, semental, de refrigeración, el metabolismo, el esperma, el análisis de semen

#### **INTRODUÇÃO**

A tecnologia de refrigeração do sêmen equino é estudada devido ao grande interesse na manutenção do potencial de fertilização do sêmen equino durante períodos prolongados (1). Sua utilização apresenta vantagens como a redução de gastos com transporte e hospedagem de animais além dos riscos de transmissão de doenças (2).

Padilla e Foote (3), Amann e Graham (4) citam que para manutenção da capacidade de fertilização dos espermatozoides é importante tomar certos cuidados durante a refrigeração e o transporte do sêmen. Qualquer alteração que ocorra durante a produção seminal, a colheita e o armazenamento do gameta masculino, poderá afetar o processo de fecundação.

Os danos causados pelo estresse térmico são decorrentes de lesões estruturais diretas, como a ruptura das membranas ou, indiretas, por alterações das funções celulares (5). Também, fenômenos semelhantes a apoptose estão sendo identificados na análise celular (6,7,8). Isto não só explica a morte celular como também os diferentes graus de

danos que comprometem a longevidade espermática (9). Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da temperatura de refrigeração e do tempo de estocagem sobre a qualidade do sêmen de diferentes garanhões.

## MATERIAL E METODOS

Foram utilizados três ejaculados de seis diferentes garanhões em idade reprodutiva das raças mangalarga marchador, brasileiro de hipismo, quarto de milha, árabe e mestiço mangalarga. Os ejaculados foram colhidos através de vagina artificial. Após a colheita o ejaculado foi filtrado para a retirada do gel, aliquotado em duas frações iguais, ambas diluídas na concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozóides/mL em meio a base de leite (Botu-Semen®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e então, submetidos a refrigerados passiva, uma até 5°C em caixa de transporte Botutainer® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e outra até 15°C em caixa de transporte Botu-Box® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).

As análises forma realizadas nos momentos 0h (sêmen fresco diluído), 12h, 24h após refrigeração. A cinética espermática foi avaliada através do HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12 (CASA), para mensuração da motilidade espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), velocidade linear (VSL) e porcentagem de espermatozóides com movimento rápido (RAP; acima de 80µm/s de velocidade de trajeto-VAP).

As análises de integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, índice de fragmentação de DNA (IFD) ativação de caspase e translocação de fosfolipídios de membrana foram efetuadas em microscópio de epifluorescência (Leica, Alemanha) ao aumento de 1000x. De cada amostra foram examinadas 200 células espermáticas.

Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial foi utilizado protocolo descrito por Nascimento et al (10). Através das associações de sondas fluorescentes iodeto de propídio (IP; 50 µg/mL; P-4170, Sigma-Aldrich) para integridade de membrana plasmática, a associação da sonda fluorescente FITC com a lecitina *Pisum sativun* (FITC-PSA; 100 µg/mL; L-0770, Sigma-Aldrich) para integridade de membrana acrossomal e JC-1 (76,5 µM; T3168, Molecular Probes) para o potencial de membrana mitocondrial. As células foram em 3 categorias, sendo elas integridade de membrana plasmática íntegra (IMP), integridade de membrana acrossomal (IMA) e alto potencial mitocondrial (APM).

Para a avaliação do IFD foi realizada o teste de Laranja de Acridina (158550, Sigma-Aldrich) de acordo com Unanian (11). A amostra de sêmen foi lavada três vezes a 700 x g por 3 minutos em 2 mL de TALP. O pellet formado foi re-suspendido com TALP para a concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Desta solução foi preparado um esfregaço e deixado secar em temperatura ambiente por 60 minutos. Os esfregaços foram imerso em Solução Carnoy (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético) para fixação durante 12 horas. A lamina seca em temperatura ambiente foi posteriormente coberta com 3 mL da solução de laranja de acridina (10mL de solução de laranja de acridina; 1µg/mL + 40mL de solução de ácido cítrico 0,1M + 2,5 mL de solução de fosfato dissódico 0,3M; pH = 2-3), ficando por 5 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. O esfregaço era lavado cuidadosamente em água destilada e antes de secar completamente coberto com lamínula.

A associação de FITC-VAD-FMK (G7462, Promega) foi utilizada como marcadora *in situ* de Casp+. O protocolo utilizado seguia as recomendações do fabricante, que previa a confecção de uma solução de PBS com  $1 \times 10^6$  espermatozoides, a qual foi adicionado 1 µL de FITC-VAD-FMK a 5mM, homogeneizado e incubado a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 20 minutos. Após a incubação a solução foi lavada (200 x g/5min) e re-suspendida em PBS respeitando-se a mesma concentração inicial e então adicionado 5 µL de IP (50 µg/mL; P-4170, Sigma-Aldrich) e 2 µL de Hoechst 33342 (40 µg/mL; H-1399, Molecular Probes Inc), aguardando 5 minutos para a posterior leitura.

Para a avaliação da translocação de fosfolípidios de membrana foi utilizada o Kit anexina V-FITC Kit I de apoptose (556547; BD Bioscience Pharmingen) de acordo com as recomendações do laboratório fabricante. Assim, alíquotas de sêmen foram diluídas em solução tampão de anexina V (10 mM HEPES/NaOH – pH 7,4 – 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) a uma concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL, 100 µL (concentração final de  $1 \times 10^5$ ) desta amostra foi colocado em criotubo tipo eppendorf e então acrescido de 5 µL de anexina V-FITC, 5 µL de IP (50 µg/mL) e 2 µL de Hoechst 33342 (40 µg/mL; H-1399, molecular Probes Inc), o material foi homogeneizado e incubado por 15 minutos.

Para a análise estatística utilizou-se o programa SAS, após a avaliação da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey para determinar diferenças significativas em todos as variáveis entre grupos, com nível de significância  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Os dados dos parâmetros avaliados da cinética espermática são apresentados na figura 1. Os parâmetros de RAP e IMA não apresentaram diferenças entre os momentos e temperaturas avaliados; para MT e VSL os grupos sêmen fresco e refrigerado à 5°C por 12 horas apresentaram maiores valores, estes foram semelhantes aos grupos refrigerados à 15°C por 12 horas e refrigerado à 5°C por 24 horas e superior ao refrigerado à 15°C por 24 horas. Para MT, os grupos sêmen fresco, refrigerado à 5°C por 12 horas e por 24 horas apresentaram altos valores em relação ao refrigerado à 15°C por 24 horas, mas refrigerado à 15°C por 12 horas foi semelhante a todos.

Para a análise de morfofuncionalidades os dados são apresentados na figura 2. Nos parâmetros de IMP, IFD e células viáveis sem translocação de fosfolipídios de membrana, o grupo sêmen fresco e refrigerado à 5°C por 24 horas diferiram entre si, mas foram semelhantes aos demais grupos. Para APM, o grupo sêmen fresco foi superior aos grupos refrigerado à 5°C e 15°C por 24 horas, enquanto que os grupos refrigerados por 12 horas foram semelhantes a todos. Para a células viáveis sem ativação de caspases os grupos refrigerado à 15°C por 12 e 24 horas e refrigerado à 5°C por 24 horas foram estatisticamente inferiores ao grupo sêmen fresco, já refrigerado à 5°C por 12 horas foi semelhante a todos os grupos.

## **DISCUSSÃO**

O objetivo principal da refrigeração do sêmen é a manutenção da viabilidade celular por um período maior favorecendo sua aplicação biotecnológica. Sabendo-se que o ejaculado de garanhões sofre alterações morfofuncionais que levam a morte devido ao seu metabolismo celular (12), e com a refrigeração espera-se diminuir este metabolismo para que a célula espermática esteja apta a fertilizar até o momento da inseminação. Na temperatura corporea o metabolismo espermático atinge seu potencial máximo, e de acordo com a Squires et al (5) a cada 10°C de queda desta temperatura seu metabolismo sofre queda de até 50%, com isso à 15°C espera-se um metabolismo celular em torno de 25% e à 5°C em torno de 10%.

De acordo com os resultados da cinética espermática pode-se observar que a utilização do sistema de refrigeração a 15°C para estocagem por 24h foi inferior para o parâmetro de motilidade total e velocidade linear em relação ao sêmen fresco, mas não houve diferença entre as temperaturas 15°C e 5°C no mesmo período e 5°C não foi diferente do sêmen fresco. Este resultado associado à motilidade progressiva que foi o único parâmetro que diferiu entre as temperaturas 5°C e 15°C à 24h, corroborando com



Varner et al. (13) e Moran et al. (14) que afirmaram que a melhor temperatura de estocagem para a manutenção tanto da motilidade quanto da fertilidade é de 4°C a 6°C.

Com relação ao período de armazenamento, de acordo com Squires et al (5), se a inseminação ocorrer até 12 horas após a colheita, o sêmen pode ser armazenado tanto a 20°C ou a 5°C, entretanto, para estocagem por tempo superior a 12 horas, o sêmen deve ser refrigerado lentamente até 5°C. De acordo com Nunes (15) a motilidade progressiva também foi a variável que sofreu maior decréscimo durante a refrigeração do sêmen em função do tempo. Resultados semelhantes também foram encontrados por Farraz et al (16) e Reghine et al. (17). Assim pode-se observar que mesmo durante a estocagem do sêmen sob baixa temperatura ocorre uma falência metabólica mais acentuada à 15°C visualizada pela queda da motilidade progressiva.

Em relação à integridade da membrana plasmática e a porcentagem de células viáveis sem translocação de fosfolipídios de membrana a refrigeração não diferiram do sêmen a fresco até às 12 horas, independente da temperatura de estocagem. Já o armazenamento a 15°C por 24h foi inferior ao sêmen fresco, entretanto a refrigeração à 5°C por 24h manteve as características espermáticas e não diferiram estatisticamente do sêmen fresco. Isso pode ser explicado, pois durante a refrigeração à 5°C há uma maior economia de energia em relação à 15°C já que ambas as taxas de refrigeração obedeceram às curvas ideais de refrigeração de no máximo 0,3°C por minuto (5,18).

Apesar da refrigeração induzir ruptura acrossomal segundo Bedford et al. (19) e segundo Gadella et al. (20) se uma amostra de sêmen já apresenta células com membrana instável a redução de temperatura já seria suficiente para desencadear a reação acrossomal, mas isso não foi observado neste trabalho, não foi encontrado diferença estatística entre as temperaturas e tempos em relação ao sêmen fresco, o que mostra que pelo menos até 24h de estocagem não ocorreu dano acrossomal.

O potencial da membrana mitocondrial foi inferior em ambas as temperaturas às 24 horas. Como as mitocôndrias estão envolvidas no início da apoptose (21) os resultados sugerem que pode estar iniciando um processo semelhante a apoptose, induzido tanto pelo frio como também pela falência metabólica, que pode ser justificado pela literatura que mostra queda na fertilidade em estocagem acima do período de 24 horas (22, 23, 24). Esta hipótese também pode ser justificada pela queda da porcentagem de células viáveis sem caspase ativada na temperatura 15°C nos dois momentos avaliados em relação ao sêmen fresco e apenas às 24 horas para a temperatura à 5°C, diferente do que aconteceu com as células viáveis sem translocação de fosfolipídios de membrana, tais resultados estão de

acordo com os reportados por Martí et al. (25) que indicaram que as caspases são ativadas na primeira fase do processo de apoptose, enquanto a translocação de fosfolipídios de membrana ficaria restrita a uma etapa posterior da apoptose.

Também observamos aumento da fragmentação de DNA no sêmen estocado à 15°C por 24 horas, corroborando com Love et al. (26) que verificaram que a temperatura de estocagem teve efeito sobre a integridade da cromatina espermática. A temperatura de 5°C preservou melhor a integridade da cromatina espermática, de 7 até 46 horas de armazenamento do sêmen, quando comparada à temperatura de 20°C (26).

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que amostras seminais mantida sob refrigeração à 5°C por 24h foram melhor preservadas do que aquelas a 15°C. Pelo período de 12 horas não houve mas já apresenta marcadores da qualidade espermática que podem influir na fertilidade do sêmen.

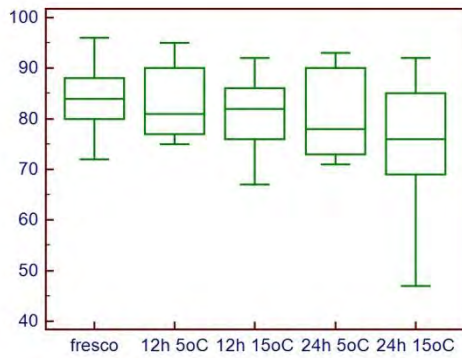
## REFERENCIAS

1. Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci.* 2011, 68:181-190.
2. Brinsko SP, Varner DD. Artificial isemination. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992,790-797.
3. Padilla AW, Foote RH. Extender and centrifugation effects on the motility patters of slow-cooled stallion spermatozoa. *J Anim Sci.* 1991, 69:3308-3313.
4. Amann RP, GrahamJK. Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger,1993, 715-745.
5. Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer, JE. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999 p.1-38. (Bulletin, 9).
6. Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TK, Pauls KP. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. *Biol Reprod.* 2002, 66:354–360.
7. Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H. Assessment of fresh and froz en-thaw ed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Therio.* 2003, 60:.677-689.
8. Martin G., Sabido O., Durand P., Levy r. Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm. *Biol Reprod.* 2004, 71:28–37.

9. Ortega-Ferrusola C, Sotilo-Galan Y, Varela-Fernandez E, Gallardo-Bolanos JM, Muriel A, Gonzalez-Fernandez, Tapia JA, Pena, FJ. Detection of “Apoptosis-Like” changes during cryopreservation process in equine sperm. *J Androl.* 2008, 29:213-221.
10. Nascimento J, Raphael CF, Andrade AFC, Alonso MA, Celeghini ECC, Arruda RP. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *J Equine Vet Sci.* 2008, 28:351-358.
11. Unanian, MM. Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. Brasília: Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia, 2000. 21p (Embrapa recursos genéticos e biotecnologia. Documentos 56)
12. Freitas-Dell’Aqua CP. Técnicas Avançadas na análise de alterações morfofuncionais de sêmen equino, 2011. 97 (Tese) – Universidade Estadual Paulista – FMVZ – Botucatu, 2011. (Capítulo 2).
13. Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoa motility parameters. *Therio.* 1988, 29:1043-53.
14. Moran DM, Jasko DJ, Squires EL, Amann RP. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Therio.* 1992, 38:999-1012.
15. Nunes DB. Container (CP) para refrigeração e preservação do sêmen equino. Campo Grande, 2006. 79. (Dissertação) - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (Dissertação)
16. Farras MC, Avanzi, BR, Melo CM, Dell’Aqua Jr JA, Papa FO. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. *Ciênc Anim Bras*, 2008, 9(3): 693-699.
17. Reghini MFS, Uliani RC, Monteiro GA, Dell’Aqua JR, JÁ, Papa FO, Alvarenga MA. Utilização da N-acetilcisteína na conservação do sêmen equino a 5°C e 15°C. IN: XI ABRAVEQ, 2010 [http://www.abraveq.com.br/artigos\\_06.php](http://www.abraveq.com.br/artigos_06.php).
18. Katila A, T. Procedures for handling fresh stallion semen. *Therio.* 1997, 48:1217-1227.
19. Bedford S, Varner D, Meyers S. Effects of cryopreservation on the acrosomal status of stallion spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl.* 2000, 56:133-140.
20. Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. Capacitation and the acrosome reaction in equine semen. *Anim Reprod Sci.* 2001, 68:249-265.
21. Camara DR, Guerra MMP, Mitochondria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). *Rev Bras Reprod Anim.* 2008, 32 (2):93-99.

23. Jasko, DJ, Squires, EL, Moran, DM, Farlin, ME. Comparison of pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen semen. In: International Congress Animal Reproduction. 1992, 12: 1439-1441.
24. Heckenbichler S, Deichsel K, Petrs P, Aurich C. Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. *Therio*. 2011, 75:849-56.
25. Martı E, Perez-Pe R, Colas C, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2008, 106:113–132.
26. Love CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Therio*. 2002, 57:1135-1142.

### MOTILIDADE TOTAL (MT)

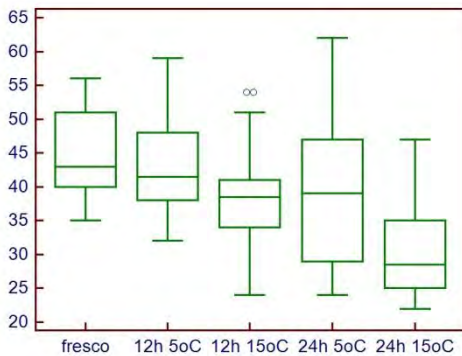


Média e desvio padrão do parâmetro de motilidade total avaliada pela análise computadorizada do movimento espermático às 0h, 12 e 24h pós refrigeração

|    | fresco                  | 12h à 5°C               | 12h à 15°C               | 24h à 5°C                | 24h à 15°C              |
|----|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| MT | 83,4 ± 6,4 <sup>a</sup> | 82,9 ± 5,4 <sup>a</sup> | 81,2 ± 7,1 <sup>ab</sup> | 80,4 ± 5,7 <sup>ab</sup> | 74,7 ± 9,9 <sup>b</sup> |

Letras diferentes indicam diferença estatística,  $p < 0,05$

### MOTILIDADE PROGRESSIVA (MP)

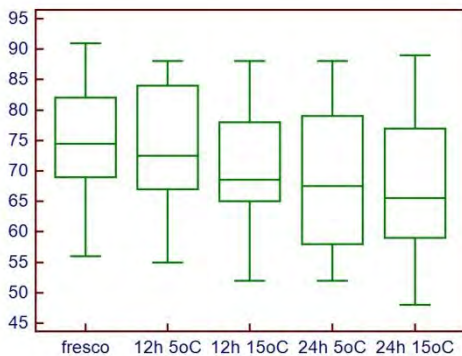


Média e desvio padrão do parâmetro de motilidade progressiva avaliada pela análise computadorizada do movimento espermático às 0h, 12 e 24h pós refrigeração

|    | fresco                   | 12h à 5°C                | 12h à 15°C               | 24h à 5°C                | 24h à 15°C               |
|----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| MP | 45,3 ± 10,8 <sup>a</sup> | 43,8 ± 10,5 <sup>a</sup> | 37,9 ± 9,7 <sup>ab</sup> | 39,8 ± 10,9 <sup>a</sup> | 29,7 ± 10,7 <sup>b</sup> |

Letras diferentes indicam diferença estatística,  $p < 0,05$

### PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES RÁPIDOS (RAP)

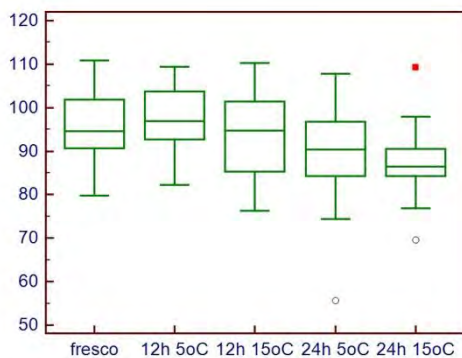


Média e desvio padrão do parâmetro de porcentagem de espermatozoides rápidos avaliada pela análise computadorizada do movimento espermático às 0h, 12 e 24h pós refrigeração

|     | fresco      | 12h à 5°C   | 12h à 15°C  | 24h à 5°C   | 24h à 15°C  |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| RAP | 73,9 ± 10,4 | 72,8 ± 10,4 | 70,7 ± 10,9 | 68,2 ± 12,3 | 64,3 ± 15,1 |

$p > 0,5$

### VELOCIDADE LINEAR (VSL)



Média e desvio padrão do parâmetro de velocidade linear avaliada pela análise computadorizada do movimento espermático às 0h, 12 e 24h pós refrigeração

|     | fresco                  | 12h à 5°C               | 12h à 15°C                | 24h à 5°C                 | 24h à 15°C              |
|-----|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| VSL | 96,5 ± 8,5 <sup>a</sup> | 96,9 ± 6,9 <sup>a</sup> | 93,2 ± 10,5 <sup>ab</sup> | 89,8 ± 12,2 <sup>ab</sup> | 86,8 ± 8,5 <sup>b</sup> |

Letras diferentes indicam diferença estatística,  $p < 0,05$

Figura 1 – Gráficos ilustrando as modificações ocorridas na cinética espermática ocorrida nos diferentes grupos e momentos: Fresco – 0h; 12h 5°C – refrigerado por 12h à 5°C; 12h 15°C – refrigerado por 12h à 15°C; 24h 5°C – refrigerado por 24h à 5°C; 24h 15°C – refrigerado por 24h à 15°C;

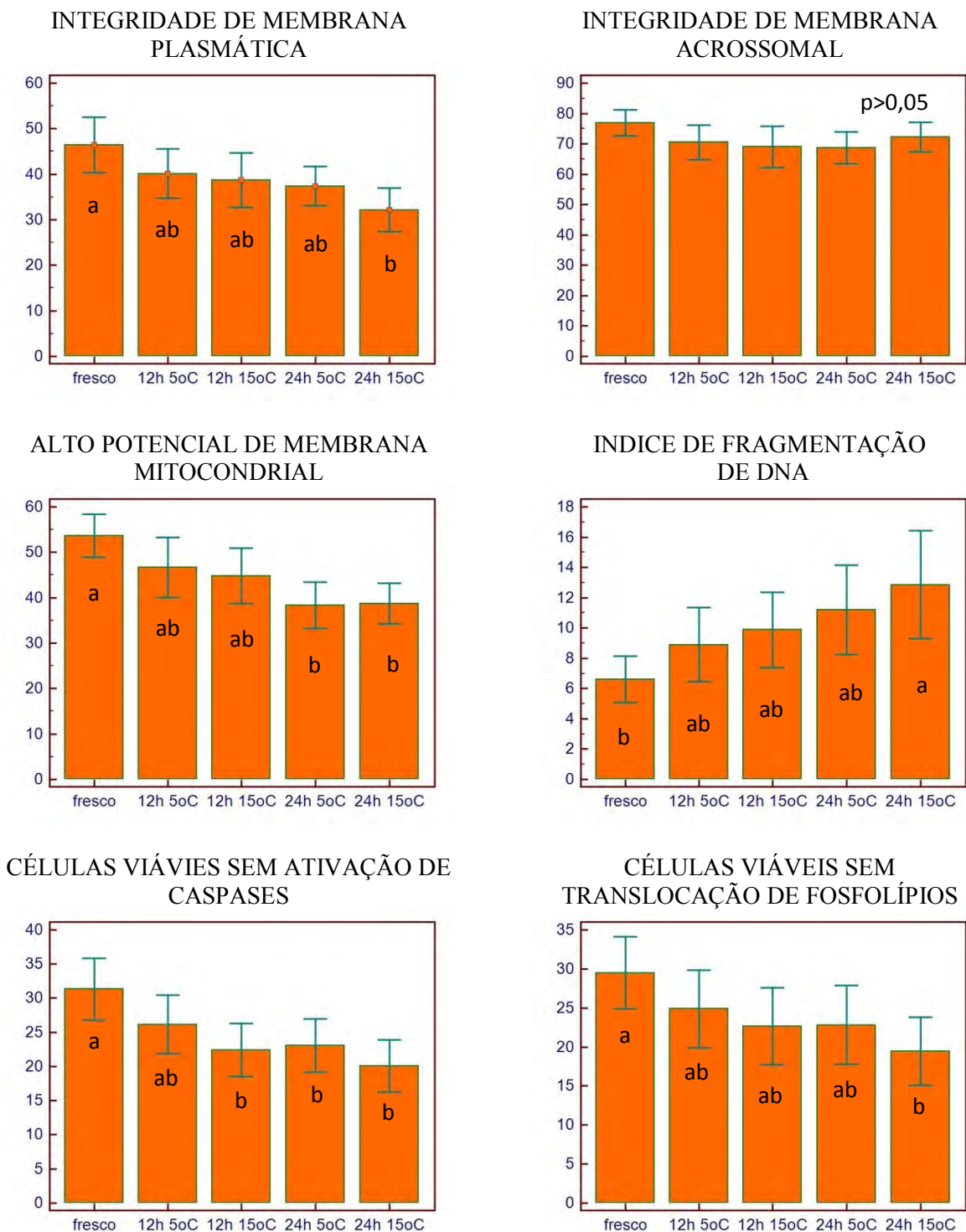


Figura 2 – Gráficos ilustrando as modificações morfofuncionais ocorridas nos diferentes grupos e momentos: Fresco – 0h; 12h 5°C – refrigerado por 12h à 5°C; 12h 15°C – refrigerado por 12h à 15°C; 24h 5°C – refrigerado por 24h à 5°C; 24h 15°C – refrigerado por 24h à 15°C; Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

# Capitulo 4

## **Relação dos marcadores da qualidade espermática com a fertilidade do sêmen descongelado de garanhões**

Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua<sup>1</sup>, Gabriel Augusto Monteiro<sup>1</sup>, José Antonio Dell'Aqua Júnior<sup>1</sup>, Frederico Ozanam Papa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar e relacionar os marcadores da qualidade espermática com a fertilidade do sêmen congelado-descongelado de garanhões. um “pool” de 3 palhetas de 4 diferentes partidas de sêmen congelado de 6 garanhões com fertilidade conhecida foram descongeladas à 46°C/20 segundos e analisadas às 0 e 4h pós descongelação. As avaliações foram realizadas por meio da análise computadorizada do sêmen e por citometria de fluxo, após a avaliação da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, os dados foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de Tukey para comparação entre os grupos de alta, média e baixa fertilidade e *unpaired t test* para as análises em relação ao tempo, para correlação com a fertilidade utilizou-se a análise de regressão múltipla, para todos os testes foi considerado nível de significância  $p < 0,05$ . De acordo com os resultados houve diferença para os parâmetros de motilidade total, integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, células viáveis sem ativação de caspases e para células viáveis sem translocação de fosfolípidos de membrana entre o grupo de alta fertilidade em relação aos demais. A motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos foi diferente entre os grupo de alta e baixa fertilidade enquanto o grupo de média fertilidade foi semelhante a ambos. O índice de fragmentação de DNA foi o parâmetro que mais qualificou aqueles com baixa fertilidade. Os resultados obtidos da análise de regressão múltipla com a fertilidade mostraram que a análise à 0h apresentou  $r^2=77,26\%$ , as análises às 4h obteve-se  $r^2=82,98$  e quando se associou as duas,  $r^2=96,42\%$ . Por tanto, quando efetuadas diversas análises é possível identificar diferenças entre animais de alta e baixa fertilidade e que a associação destes marcadores com a fertilidade do sêmen apresentou um alto coeficiente de determinação o que pode reduzir as incertezas inerentes a previsão da fertilidade na avaliação in vitro do sêmen.

Palavras chaves: garanhão, sêmen, criopreservação, fertilidade



## ABSTRACT

The objective was to evaluate and compare the influence of these changes on fertility rates between semen at various temperatures and in frozen semen. A "pool" of three different samples each of 4 ejaculates of frozen semen from six stallions with known fertility were thawed at 46°C for 20 s and analyzed at 0 and 4 h after thawing. The evaluations included computer analysis of the semen and flow cytometry. After the evaluation of normality with the Kolmogorov-Smirnov test, data were subjected to an analysis of variance, followed by a Tukey test for comparison between the high, medium and low fertility groups. An unpaired t test was used for the analysis over time, and a multiple regression analysis was used to determine the correlation with fertility; for all tests, the significance level was set at  $p < 0.05$ . The differing results for the parameters of total motility, plasma membrane and acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, viable cells without activation of caspases and viable cells without membrane translocation of phospholipids suggest that these parameters may be indicators of high fertility. Progressive motility and the percentage of fast spermatozoa differed between the high and low fertility groups, whereas these parameters were similar when fertility was average. The presence of DNA fragmentation was most strongly associated with low fertility. The results of multiple regression analysis of fertility showed that  $r^2=77.26$  at 0 h,  $r^2=82.98$  at 4 h, and  $r^2=96.42$  when these two time points were combined. Therefore, when several analyses were performed, it was possible to identify differences between the high and low fertility animals. In addition, the association of these markers with semen fertility showed a high predictive value which can reduce the uncertainties in the prediction of fertility during the in vitro evaluation of semen.

Keywords: stallion, semen, cryopreservation, fertility

## INTRODUÇÃO

A utilização de sêmen congelado equino representa uma biotécnica reprodutiva de grande importância para o melhoramento genético animal. Entretanto, as metodologias de análise espermática pouco contribuem para predição do potencial de fertilização de uma amostra. Além disso, espermatozoides criopreservados de garanhões exibem um alto grau de variabilidade individual em relação a viabilidade celular após o descongelamento (HOFFMAN et al., 2011).

Como os espermatozoides representam células complexas que dependem da funcionalidade de múltiplos atributos para exercerem seu papel natural na reprodução,

ocorrem falhas nos métodos tradicionais de avaliação, observando-se, geralmente, correlações baixas ou variações entre os padrões de qualidade das amostras seminais avaliadas laboratorialmente e os índices de fertilidade (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009).

Existem diversas variáveis envolvidas na viabilidade e longevidade do sêmen, tais como: fatores físicos, morfológicos, bioquímicos e metabólicos inerentes à célula espermática, que é constituída de vários compartimentos, tais como membrana plasmática, membrana acrossomal e bainha mitocondrial. Para o funcionamento normal da célula é necessário que estes compartimentos estejam com suas funções preservadas (GRAHAM et al., 1980).

Para que a inseminação artificial possa apresentar melhores resultados na espécie equina, é necessário um estudo mais amplo sobre os vários aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática e à melhoria dos testes aplicados para analisar a viabilidade dos espermatozoides submetidos à refrigeração, congelação e descongelação, uma vez que os danos ocasionados pela criopreservação causam prejuízos às funções celulares, resultando nos índices de fertilidade redução da fertilidade (ARRUDA et al., 2007). Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar e relacionar os marcadores da qualidade espermática com a fertilidade do sêmen congelado-descongelado de garanhões de alta, média e baixa fertilidade.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A avaliação das amostras foi realizada imediatamente pós-descongelação (0h) e após 4 horas com o sêmen mantido a temperatura laboratorial (18-22°C). Foram utilizados 6 animais com fertilidade conhecida e classificados de acordo com o quadro 1, sendo que de cada animal foi utilizado um “pool” de 3 palhetas de 4 diferentes partidas de acordo com a fertilidade classificada (tabela 4). As palhetas foram descongeladas a 46°C/20 segundos, colocadas em criotubo tipo eppendorff e então submetidas às análises descritas abaixo.

Tabela 6- Classificação dos animais utilizados no experimento de acordo com a sua fertilidade (porcentagem calculada através dos dados de prenhez/número de inseminações - %).

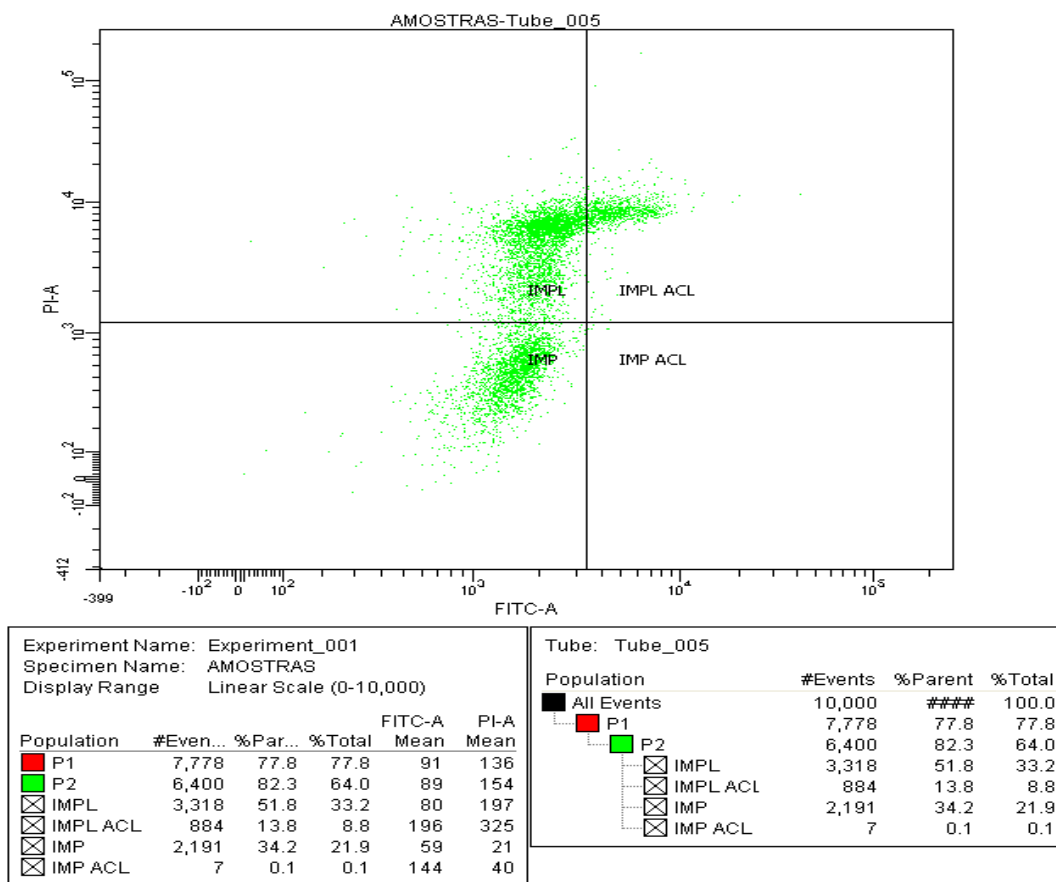
| CLASSIFICAÇÃO | FERTILIDADE    |
|---------------|----------------|
| Alta (G1)     | ≥60%           |
| Média (G2)    | Entre 30 e 60% |
| Baixa (G3)    | ≤30%           |

**Análise da cinética espermática:** Um “pool” de cada amostra foi descongelado e analisado por meio do sistema HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12 (CASA), para mensuração da motilidade espermática total (MT, %), motilidade espermática progressiva (MP, %) e porcentagem de espermatozóides com movimento rápido (RAP, %).

**Análise por citometria de fluxo:** Para as análises de citometria de fluxo, 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. De acordo com as análises descritas a seguir.

***Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal***

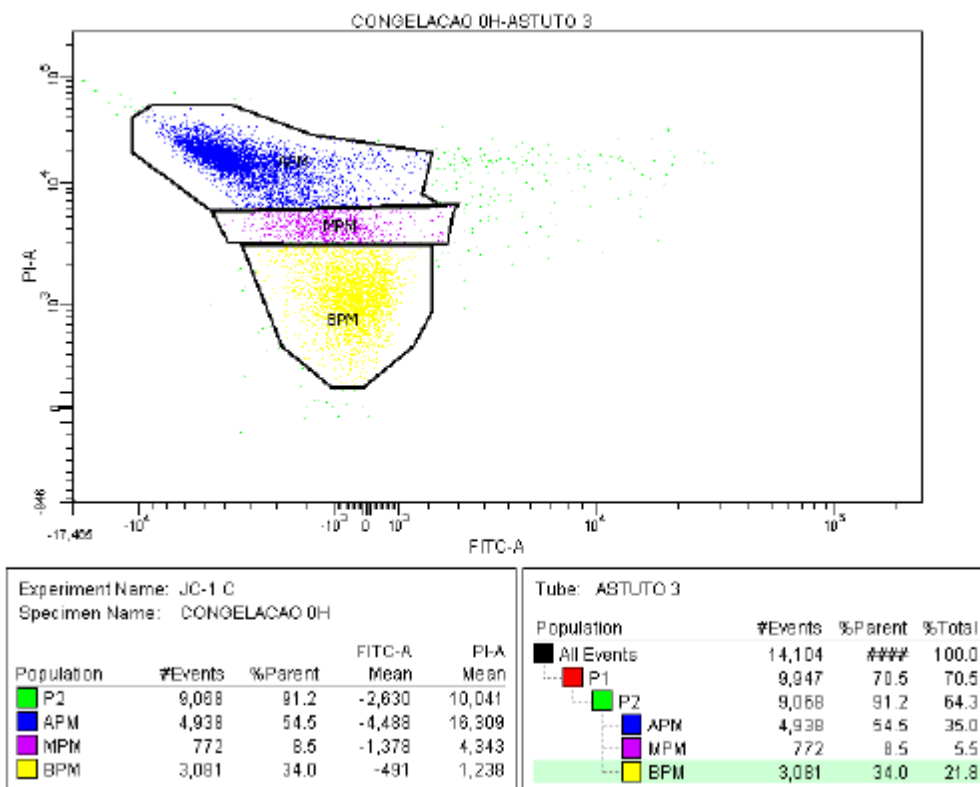
Para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal foram utilizadas as sondas iodeto de propídio (IP; 28,707-5, Sigma), FITC-PSA (L-0770, Sigma) de acordo com protocolo desenvolvido por Arruda et al. (2003) modificado com a adição do Hoechst (H33342, 100µg/mL, h-1399, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA). Assim, numa amostra de 400 µL de sêmen diluído em TALP na concentração de  $10 \times 10^6$  espermatozóides/mL foram adicionados 2 µL de H3342 (100µg/mL), incubado por 5 min à 37°C, então 2µL de IP (0,02 mg/mL) e 4 µL de FITC-PSA (5 mg/mL), e então homogeneizados e incubados por mais 10 minutos na mesma temperatura ao abrigo da luz.



**Figura 2:** Gráfico *dot-plot* gerados pela análise de células por citometria de fluxo. Amostra para avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal utilizando a associação de H3342, IP e FITC-PSA permitindo a classificação dos espermatozoides eqüinos em quatro classes: IMPL- Membrana plasmática lesada e acrossomal integra; IMPLACL- Membrana plasmática e acrossomal lesadas; IMP- Membrana plasmática e acrossomal integras; e, IMPACL- Membrana plasmática integra e acrossomal lesada

### *Avaliação do potencial mitocondrial*

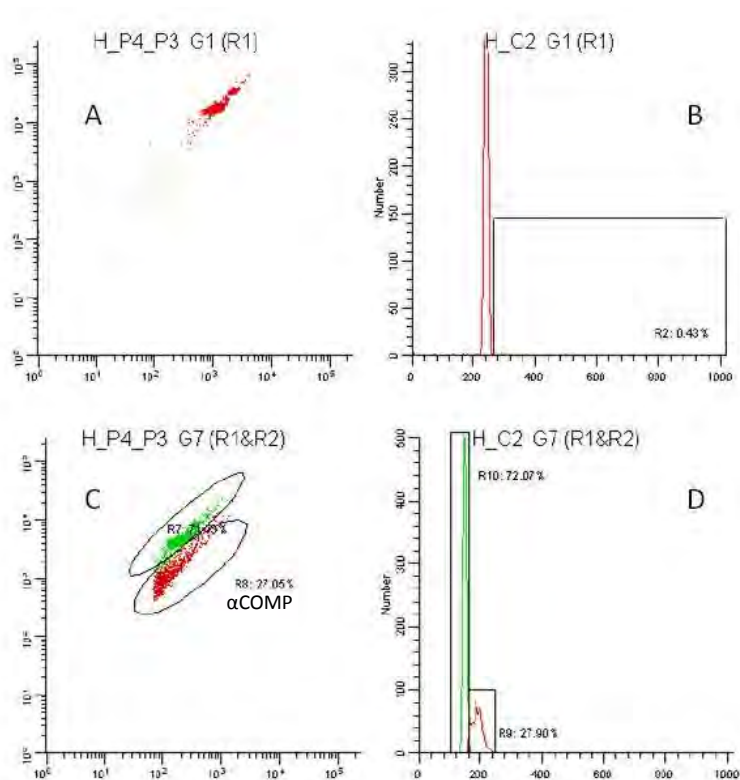
Para esta avaliação do potencial mitocondrial foram utilizadas as sondas JC-1 (T3168, Molecular Probes) de acordo com também modificado pela utilização de Hoechst 33342 (figura 5). Com uma solução estoque de 1,53mM de JC-1 foi preparada em DMSO. Uma alíquota de 500µL foi corada com 1µL da solução estoque por 40 min a 25°C. Após este período 100µL desta solução foi diluído 1:5 em TALP contendo 2µM de JC-1 e imediatamente avaliado por citometria de fluxo.



**Figura 3:** Gráfico *dot-plot* gerados pela análise de células por citometria de fluxo. Amostra para avaliação do potencial mitocondrial utilizando o fluorocromo JC-1, permitindo a classificação dos espermatozoides eqüinos em três classes: APM-Alto potencial mitocondrial; MPM- Médio potencial mitocondrial; e, BPM- Baixo potencial mitocondrial;

### *Avaliação do índice de fragmentação de DNA*

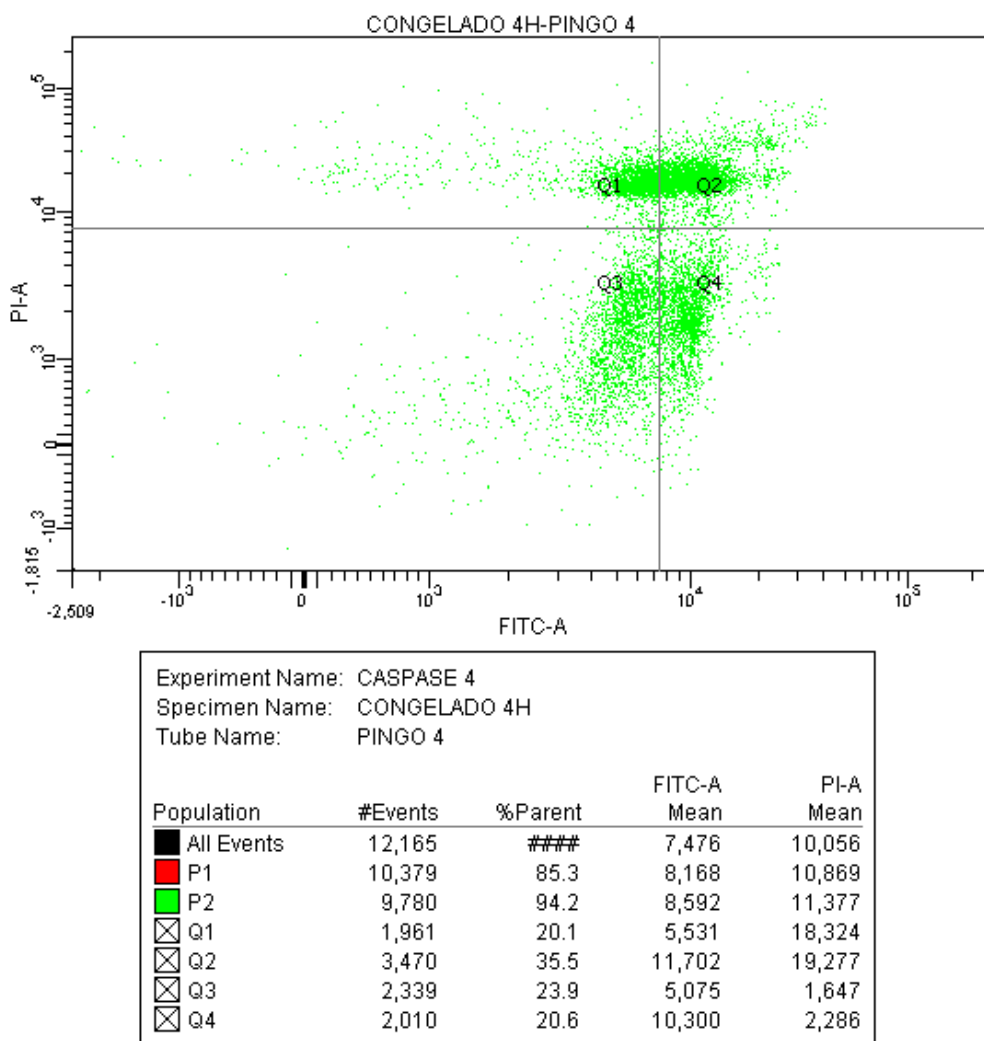
Este ensaio foi realizado como descrito por Evenson (1986), onde uma alíquota de sêmen foi diluída em 200  $\mu$ L de uma solução tampão (0,186g de EDTA dissódico, 0,790 g de Tris-HCl, 4,380 g NaCl em 500 mL água deionizada, pH 7.4). Esta foi misturada com 400  $\mu$ L de solução de ácido detergente (2,19 g NaCl, HCl 1,0 ml de 2N solução, 0,25 ml Triton-X, qsp. 250 ml de água deionizada). Após 30 segundos, 1,2 ml da solução de acridina orange (AO; 3,8869 g de ácido cítrico mono-hidratado, 8,9429 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4,3850g NaCl, 0,1700 g de EDTA dissódico, 4  $\mu$ g/ml de solução acridina orange (1 mg / ml), qsp. 500 ml de água, pH 6.0). A amostra foi então coberta com papel-alumínio durante a avaliação. A citometria de fluxo foi realizada em 5 minutos e os dados arquivados em CD para posterior análise através do software WinList 6.0 (Verify software house) de acordo com Flaherty et al. (2008).



**Figura 4:** Dados de SCSA de sêmen obtido de garanhão de alta fertilidade (A e B) e Baixa fertilidade (C e D). De acordo com o gráfico *dot-plot* gerado em A, a população é mais homogênea, enquanto que no gráfico C é mais heterogênea (células fora da população principal – AlfaCOMP).

#### *Avaliação do índice de caspase-ativada*

A associação de FITC-VAD-FMK (G7462, Promega, Madison WI, EUA) foi utilizada como marcadora *in situ* de caspase ativada e IP de acordo com as recomendações do laboratório também modificado com a utilização do Hoechst 33342 (figura 4). Em 1 mL de uma solução de PBS com  $1 \times 10^6$  espermatozoides foi adicionado 1  $\mu$ L de FITC-VAD-FMK a 5mM, e então homogeneizada e incubada em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 20 minutos. Após a incubação esta solução foi lavada (200g/5min) e ressuspensa em PBS com a concentração inicial e então foi adicionado 5  $\mu$ L de IP (50  $\mu$ g/mL).

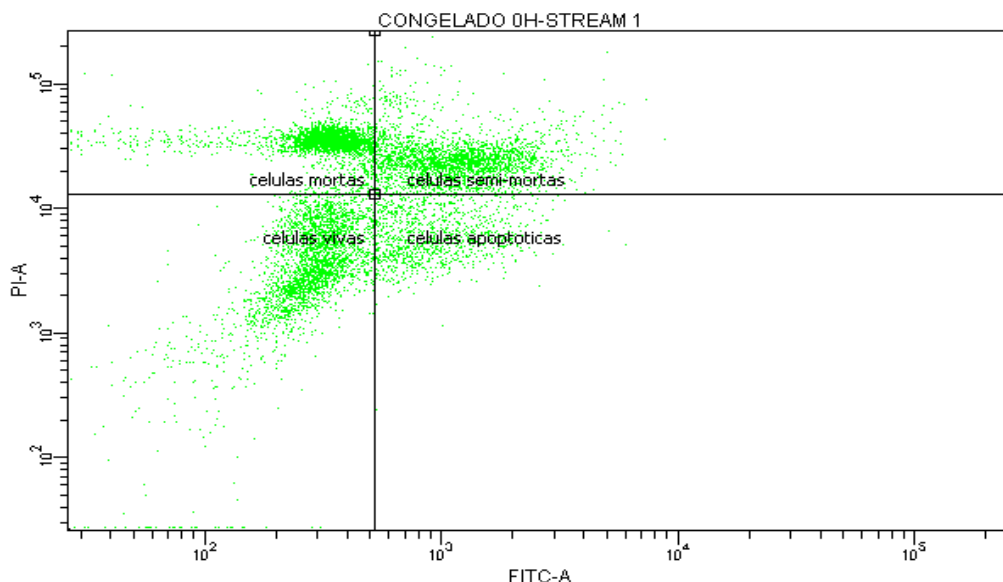


**Figura 5:** Gráfico *dot-plot* gerados pela análise de células por citometria de fluxo. Amostra para avaliação da ativação de caspase utilizando a associação de H33342, IP e FITC-VAD-Fmk permitindo a classificação dos espermatozoides eqüinos em quatro classes: Q1- células mortas; Q2- células semi-mortas; Q3- células viáveis; e, Q4- células apoptóticas.

#### ***Avaliação da translocação de fosfolípidios de membrana.***

Para esta avaliação foram utilizadas as sondas anexina V-FITC Kit de apoptose (6710KK; Pharmingen) e IP de acordo com as recomendações do laboratório. Também modificada com a utilização do Hoechst 33342 (figura 5). Assim, alíquotas de sêmen serão diluídas em solução tampão de anexina V (10 mM HEPES/NaOH – pH 7,4 – 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) a uma concentração de 2x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL; um volume de 100 µL (concentração final de 2x10<sup>5</sup>) desta amostra foi colocado em um tubo de cultura de 5 mL e então acrescido de 5 µL de anexina V-FITC e 5 µL de IP (50 µg/mL). A amostra foi homogeneizada e incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Foi adicionado 400

$\mu\text{L}$  de solução tampão de anexina V para uma concentração final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL.



| Experiment Name: ANEXINA SF2 |         |         |            |            |
|------------------------------|---------|---------|------------|------------|
| Specimen Name: CONGELADO 0H  |         |         |            |            |
| Tube Name: STREAM 1          |         |         |            |            |
| Population                   | #Events | %Parent | FSC-A Mean | SSC-A Mean |
| All Events                   | 13,241  | ###     | 43,220     | 44,943     |
| P1                           | 10,071  | 76.1    | 51,481     | 47,229     |
| P2                           | 9,553   | 94.9    | 50,878     | 48,207     |
| celulas mortas               | 3,050   | 31.9    | 50,676     | 44,237     |
| celulas semi-mortas          | 2,458   | 25.7    | 51,113     | 49,266     |
| celulas vivas                | 2,957   | 31.0    | 52,722     | 52,141     |
| celulas apoptoticas          | 1,088   | 11.4    | 45,903     | 46,249     |

**Figura 6:** Gráfico *dot-plot* gerados pela análise de células por citometria de fluxo. Amostra para avaliação da translocação de fosfolípidios de membrana utilizando a associação de H3342, IP e FITC Anexina permitindo a classificação dos espermatozoides eqüinos em quatro classes.

### *Análise estatística*

Os dados foram analisados utilizando-se o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System Institute Inc. 1998). Para a análise estatística do efeito dos tratamentos (G1, G2 e G3) nas amostras de sêmen, foi realizado o cálculo das médias ( $\bar{X}$ ) e desvio padrão (DP) para os parâmetros avaliados, com análise de variância em blocos aleatórios e contrastes entre médias pelo método Tukey. Para a análise do efeito do tempo nas amostras de sêmen foi realizado *unpaired t tes*. Para avaliar a correlação entre os marcadores da qualidade seminal do sêmen congelado-descongelado e a fertilidade foi realizada regressão múltipla. Em todas as análises foi adotado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).



## RESULTADOS

Os dados dos parâmetros avaliados são apresentados na tabela 5. Logo após a descongelação o grupo G1 foi superior estatisticamente em relação ao G2 e G3 para os parâmetros de MT, MPAI, APM, células viáveis sem ativação de caspases e células viáveis sem translocação de fosfolipídios de membrana. Para o parâmetro IDF o G1 e G2 foram inferiores ao G3 e para MP e RAP, G1 e G2 foram semelhantes entre si e superiores ao G3.

No momento 4h pós-descongelação a superioridade do G1 em relação ao G2 e G3 foi para os parâmetros de MPAI e células sem translocação de fosfolipídios de membrana. Para IDF, MP, APM e RAP G1 e G2 foram semelhantes entre si e diferentes de G3 e para MT não houve diferença estatística enquanto que para células viáveis sem ativação de caspases  $p=0,0825$ .

Em relação ao tempo, os animais do G1 apresentaram diferenças estatísticas para os parâmetros MT, MP, RAP, APM, células viáveis sem ativação de caspases e sem translocação de fosfolipídios de membrana. O G2 apresentou diferenças para MP, APM e células viáveis sem translocação de fosfolipídios de membrana, não apresentou diferenças para MPAI e IDF, enquanto que em MT obteve-se  $p=0,0765$ , RAP  $p=0,0562$  e células viáveis sem ativação de caspases  $p=0,0745$ . No G3 houve diferença estatística para MP, APM e células viáveis sem translocação de fosfolipídios de membrana, não houve diferença estatística para MPAI, IDF e células viáveis sem caspases ativadas, já para MT  $p=0,0706$  e para RAP  $p=0,0806$ .

Tabela 8 – Média e desvio padrão dos parâmetros avaliados através da análise computadorizada do sêmen e por citometria de fluxo dos grupos G1 (garanhões com alta fertilidade, n=8), G2 (garanhões de média fertilidade, n=8), G3 (garanhões de baixa fertilidade, n=8) das amostras de sêmen congelado-descongelado de cada garanhão nos momentos 0h e 4h pós-descongelação.

|  | Tempo | G1                        | G2                         | G3                         |
|--|-------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Motilidade Total (%)   | 0h    | 80,3 ± 3,0 <sup>aA</sup>  | 64,8 ± 13,9 <sup>b</sup>   | 57,3 ± 14,1 <sup>b</sup>   |
|  | 4h    | 59,6 ± 9,5 <sup>B</sup>   | 54,4 ± 13,2                | 43,8 ± 20,0                |
| Motilidade Progressiva (%)   | 0h    | 44,0 ± 5,3 <sup>aA</sup>  | 32,6 ± 9,6 <sup>abA</sup>  | 29,5 ± 12,8 <sup>bA</sup>  |
|  | 4h    | 28,8 ± 4,8 <sup>aB</sup>  | 23,4 ± 5,2 <sup>abB</sup>  | 18,9 ± 10,1 <sup>bbB</sup> |
| Espermatozóides Rápidos (%)  | 0h    | 69,3 ± 4,3 <sup>aA</sup>  | 53,8 ± 14 <sup>ab</sup>    | 42,0 ± 17,2 <sup>b</sup>   |
|  | 4h    | 53,9 ± 5,8 <sup>aB</sup>  | 42,8 ± 11,9 <sup>ab</sup>  | 29,8 ± 15,9 <sup>b</sup>   |
| Membrana Plasmática e Acrossomal<br>Íntegras (%)                     | 0h    | 51,9 ± 11 <sup>a</sup>    | 33,8 ± 6,7 <sup>b</sup>    | 30,0 ± 8,4 <sup>b</sup>    |
|  | 4h    | 39,6 ± 7,4 <sup>a</sup>   | 29,9 ± 7,9 <sup>b</sup>    | 26,1 ± 5,5 <sup>b</sup>    |
| Alto potencial Mitocondrial (%)                                      | 0h    | 68,6 ± 4,9 <sup>aA</sup>  | 56,9 ± 11,3 <sup>baA</sup> | 56,8 ± 8,5 <sup>baA</sup>  |
|  | 4h    | 52,4 ± 5,9 <sup>aB</sup>  | 43,4 ± 9,1 <sup>abB</sup>  | 28,6 ± 7,4 <sup>bbB</sup>  |
| Índice de Fragmentação de DNA<br>(%)                                 | 0h    | 0,8 ± 0,4 <sup>b</sup>    | 1,2 ± 0,4 <sup>b</sup>     | 5,2 ± 5,3 <sup>a</sup>     |
|  | 4h    | 1,1 ± 0,6 <sup>b</sup>    | 1,4 ± 0,6 <sup>b</sup>     | 8,9 ± 9,3 <sup>a</sup>     |
| Células viáveis sem ativação de<br>caspases (%)                      | 0h    | 49,2 ± 5,6 <sup>aA</sup>  | 37,7 ± 10,1 <sup>b</sup>   | 32,0 ± 8,0 <sup>b</sup>    |
|  | 4h    | 36,1 ± 8,1 <sup>B</sup>   | 31,9 ± 10                  | 25,3 ± 9,4                 |
| Células viáveis sem translocação de<br>fosfolipídios de membrana (%) | 0h    | 47,5 ± 11,7 <sup>aA</sup> | 35,1 ± 8,4 <sup>baA</sup>  | 27,4 ± 6,8 <sup>baA</sup>  |
|  | 4h    | 34,7 ± 4,5 <sup>aB</sup>  | 22,0 ± 9,5 <sup>bbB</sup>  | 20,7 ± 3,2 <sup>bbB</sup>  |

<sup>a,b</sup> na mesma linha diferem estatisticamente p<0,05;

<sup>A,B</sup> na mesma coluna diferem estatisticamente p<0,05

De acordo com a análise de regressão múltipla dos parâmetros espermáticos obtidos às 0h de análise pós-descongelação foi  $r^2=77,26\%$  com  $p=0,001$ , considerado extremamente significativo. Já para os parâmetros obtidos às 4h  $r^2$  foi de  $82,98\%$ , com  $p=0,0001$ , também considerado muito significativo. Mas quando se associou todas as análises, ou seja, 0h e 4h pós-descongelação, obteve-se  $r^2=96,42\%$ , com  $p=0.0014$ , também muito significativo.

## DISCUSSÃO

A motilidade é considerada um importante parâmetro para a avaliação da qualidade de sêmen em várias espécies (CONTRI et al., 2010). A estimativa da motilidade é um passo essencial para a avaliação da fertilidade do macho e pode ser considerado um teste funcional, pois mostra o status energético da célula espermática (QUINTERO-MORENO et al., 2004). Neste trabalho foi mostrado que a motilidade total foi um parâmetro importante para diferenciar os animais de alta fertilidade daqueles de média e baixa no momento logo após a descongelação, já após o período de 4h esse parâmetro não fornece informações que permitam sugerir que uma amostra vai apresentar maior ou menor predição de boa fertilidade, pois não demonstram diferenças entre animais de alta, média e baixa fertilidade conhecida.

Entre os animais de alta e média fertilidade apresentaram resultados similares de MP e foram superiores aos de baixa qualidade. Isso pode ser justificado, pois esses espermatozóides chegar aos reservatórios com maior facilidade, e, além disso, sabe-se que em humanos o decréscimo da motilidade progressiva é um dos principais indicadores do crio-dano que pode resultar em queda da fertilidade (OEHNINGER et al., 2000). Resultado similar foi observado em recente trabalho de Love (2011) onde os animais de alta e média fertilidade apresentaram resultados superiores de motilidade progressiva aos de baixa qualidade quando estes foram classificados de acordo com o número de prenhez por ciclo em sêmen refrigerado.

O mesmo ocorreu em relação a porcentagem de espermatozóides rápidos, onde observou-se que os animais de alta e média fertilidade apresentaram valores superiores em relação aos de baixa fertilidade, assim este parece ser um fator importante na caracterização da qualidade seminal apesar de ser pouco avaliado na maioria dos trabalhos em eqüinos.

A integridade de membrana plasmática e acrossomal foram superiores no grupo de alta fertilidade em relação aos demais, demonstrando que animais que suportam melhor o processo de criopreservação, manterão uma maior integridade estrutural indispensável para que o espermatozóide mantenha sua capacidade de fertilizar o ovócito (SILVA e GADELA 2006). A integridade de membrana plasmática é um pré-requisito para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização, que incluem capacitação espermática, ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gametas (PAPA et al., 2000). Os resultados deste trabalho corroboram com os resultados de Freitas-Dell'Aqua et al. (2011) onde IMP pós descongelação apresentou correlação positiva com a fertilidade

( $r=0,8047$ ). Em bovinos embora existam relatos indicando grande variabilidade entre a correlação dos índices de fertilidade e a integridade de membrana plasmática do sêmen bovino congelado (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003), trabalhos sinalizam para a efetividade da técnica como ferramenta de análise das amostras seminais, o número de espermatozoides viáveis expressos por meio da integridade da membrana plasmática correlacionou-se positivamente com fertilidade ( $r=0,68$ ), representando a variável de maior impacto isolado na predição da fertilidade seminal (JANUSKAUSKAS et al., 2003).

De acordo com Camara et al. (2008) o início da apoptose se dá pela perda do potencial mitocondrial, assim uma das vantagens da utilização de marcadores da integridade funcional das mitocôndrias é que alterações neste sistema são detectáveis em estágios que antecedem as lesões de DNA (DONNELLY et al., 2000). Este fato foi revelado neste estudo onde os animais de alta fertilidade apresentaram maiores valores de potencial mitocondrial em relação aqueles de média e baixa fertilidade nos dois momentos avaliados. Isso pode ser explicado pela função da mitocôndria, essas organelas são requeridas para o eficiente metabolismo energético, a produção de lipídeos de membrana e o crescimento celular, mas também são as determinantes primárias da vida ou da morte celular (ARENDS e WYLLIE, 1991). O envolvimento da mitocôndria na apoptose inclui a ativação de cisteínas conhecidas como caspases, a perda do potencial de membrana mitocondrial (PMM), as variações no potencial de oxi-redução e o envolvimento de proteínas pró e antiapoptose (DONNELLY et al., 2000).

Nos estudos em humanos e eqüinos observa-se correlação negativa entre fertilidade e integridade de DNA (MORRELL et al., 2008). Assim, a concepção depende, entre outros fatores, da habilidade da cromatina espermática previamente condensada em se descondensar e formar o pronúcleo masculino durante a interação com o ovócito (MADRID-BURY et al., 2005). A fragmentação do DNA genômico é considerada um dos marcadores da apoptose, conhecida como a forma mais comum de morte das células eucarióticas (DONNELLY et al., 2000). Isto pode alterar a capacidade fecundante destas células ou em etapas mais tardias, como alterações no desenvolvimento embrionário, casos de abortamento ou fetos com defeitos congênitos (HENKEL et al., 2004). Neste estudo observou-se que animais com alta fertilidade apresentaram menores IDF em todos os momentos avaliados corroborando com outros estudos em eqüinos (LOVE, 2005). Enquanto que aqueles com média fertilidade não diferiram daqueles com baixa fertilidade diferente do que ocorreu em outros trabalhos do mesmo grupo citado acima (LOVE, 2005; LOVE et al., 2001), isto pode ter ocorrido pois o IDF não é o único fator que altera a

fertilidade do sêmen, portanto outros fatores devem ser responsáveis pela queda da fertilidade.

Levando-se em consideração outros dois eventos da cascata apoptótica, tais como ativação de caspases e translocação da fosfatidilserina na membrana plasmática foi proposto neste trabalho a análise apenas das células viáveis, visto que a porcentagem de células com algum marcador de apoptose não diferiram entre os grupos (dados não mostrados) pois apenas células sem marcador de apoptose seriam aptas para a fertilização. Como ocorreu com os demais parâmetros foi observado que os animais de alta fertilidade foram superiores aos demais no momento 0h, o que justifica a escolha da análise apenas das células viáveis visto que apenas estas células que se apresentam íntegras são capazes de fertilizar o ovócito.

Tanto a porcentagem de células viáveis sem ativação de caspase quanto as sem translocação de fosfolípidios de membrana foram diferentes entre os animais de alta fertilidade em relação aos de média e baixa, segundo Martí et al. (2008) que indicaram que as caspases são ativadas na primeira fase do processo de apoptose, enquanto a translocação de fosfolípidios de membrana ficaria restrita a uma etapa posterior da apoptose, esses resultados sugerem que a diferença entre os grupos em relação a translocação de fosfolípidios de membrana pode estar mais relacionada ao criodano causado pelo processo de criopreservação do que em relação a apoptose.

Resumidamente, os animais de alta fertilidade apresentaram pós-descongelção MT, MPAI, alto potencial mitocondrial, células viáveis sem ativação de caspases e células sem translocação de fosfolípidios de membrana significativamente superiores aos de média e baixa fertilidade, demonstrando que estes parâmetros qualificam aqueles animais que suportam melhor o processo de congelação. Já para os parâmetros de MP e RAP os animais de alta e baixa foram significativamente diferentes enquanto que os animais de média fertilidade foram intermediários sugerindo que altos valores são melhores para a fertilidade. Já o IFD foi o parâmetro que determinou aqueles com baixa fertilidade.

Em relação ao comportamento das características seminais analisadas pós-descongelção nos momentos 0 e 4h, observou-se queda nas taxas de motilidade progressiva, potencial mitocondrial e células com translocação de fosfolípidios de membrana. Estes dados são condizentes com trabalho prévio em sêmen fresco (FREITAS-DELL'AQUA et al. - capítulo 3) onde com o decorrer do tempo a viabilidade espermática diminuiu devido a exaustão dos nutrientes necessários para a produção de ATP. Um fato interessante foi o parâmetro de MPAI, que apesar da queda numérica não diferiu

estatisticamente em nenhum dos grupos avaliados, mostrando que esta queda da qualidade seminal é um sinal mais tardio que as características do que a MP, da diminuição do potencial mitocondrial e da translocação de fosfolipídio de membrana. Neste caso estas alterações podem ser explicadas como fatores semelhantes a apoptose, pois segundo Kroemer et al (1997) a seqüência normal de eventos que determinam a apoptose é a diminuição do potencial de membrana mitocondrial seguido pela fragmentação do DNA nuclear, a produção de espécies reativas ao oxigênio e, finalmente, o aumento na permeabilidade da membrana.

Sabe-se que individualmente nenhum teste laboratorial é capaz de prever a fertilidade de uma amostra seminal já que é necessário uma série de atributos aos espermatozoides para estes serem capazes de fertilizar (SEVERO, 2009, MAZZIEIRO et al., 2009, FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009), embora estes trabalhos sejam em bovinos o mesmo vale para eqüinos. Em eqüinos os trabalhos mais recentes (LOVE, 2011; HECKENBICHLER et al., 2011; FOSTER et al., 2011), trabalharam com sêmen refrigerado, mas avaliaram a correlação da fertilidade com parâmetros individuais e apesar de em alguns casos apresentarem  $p < 0,05$  a relação nunca era maior que  $r = 0,5$ .

Assim foi proposto realizar uma regressão múltipla utilizando todos os parâmetros avaliados. Os resultados obtidos mostraram que a análise à 0h já mostra uma boa relação com a fertilidade ( $r^2 = 77,26\%$ ) já com as análises às 4h obteve-se  $r^2 = 82,98$ , melhor correlação obteve-se ainda quando se associou as duas,  $r^2 = 96,42\%$ , mas ainda é necessário novos experimentos onde após a avaliação do sêmen este seja classificado em um dos grupos e depois seja realizada uma fertilidade a campo controlada experimentalmente para verificar se os dados laboratoriais irão condizer com a fertilidade obtida.

## CONCLUSÃO

Com isso pode-se concluir que há heterogenicidade entre as a mostras de sêmen; essas diferenças podem ser observadas através das análises; e é possível identificar amostras com maior potencia de fertilidade.

## REFERÊNCIAS

ARENDS MJ, W YLLIE AH. Apoptosis: mechanisms and role in pathology. **Int Rev Exp Pathol**, v.32, p.223-254, 1991.

- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **A Scie Vet**, v.31, p.226-227, 2003.
- ARRUDA, R.P., ANDRADE, A.F.C., PERES, K.R., RAPHAEL, C.F., NASCIMENTO, J., CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31(1), p.8-16, 2007.
- CAMARA DR, GUERRA MMP, Mitochondria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP.). **Rev Bras Reprod Anim**, v.32, n.2, p.93-99, 2008.
- CONTRI, A., VALOR, C., FAUSTINI, M., WEGHER, L., CARLCCIO, A., Effect of semen preparation on casa motility results incryopreserved bull spermatozoa. **Therio** v.74, p.424-35, 2010.
- DONNELLY ET, O'CONNELL M, MCCLURE N, LEWIS SE. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Hum Reprod**, v.15, p.1552-1561, 2000
- FLAHERTY, C.O.; VAISHEVA, F.; HALES, B.F., CHAN, P.; ROBAIRE, B. Characterization of sperm chromatin quality in testicular cancer and Hodgkin's lymphoma patients prior to chemotherapy. **Hum Reprod** p.1-9, 2008.
- FOSTER ML, VARNER DD, HINRICHS K, TEAGUE S, LACAZE K, BLANCHARD TL, LOVE CC. Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm. **Therio**, v.65, p. 1499-1505, 2011.
- FREITAS-DELL'AQUA CP, CRESPILO AM, PAPA FO, DELL'AQUA JUNIOR JA. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Rev Bras Reprod Anim**, v.33, p.213-222, 2009.
- FREITAS-DELL'AQUA CP, MONTEIRO GA, DELL'AQUA JR JA, PAPA FO. Avaliação dos marcadores da qualidade espermática em semen refrigerado à 5 e 15°C **(capítulo 3)**.
- FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; DELL'AQUA JR, J.A., ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O. Correlação do índice de fragmentação de DNA do sêmen congelado de garanhões através do teste de Acridina Orange com a fertilidade. In: XXV Reunião anual da sociedade Brasileira de Tecnologia de embrião, **A Scie Vet** 2011.
- GRAHAM EF, SCHMEHL MKL, NELSON DS. Problems with laboratory assays **Proc 8<sup>th</sup> tech ConfAI and reprod NAAB**, p. 1-8, 1980
- HECKENBICHLER S, DEICHSEL K, PETRS P, AURICH C. Quality and fertility of cooled-shipped stallion sêmen at the time of insemination. **Therio**, v.75, p.849-56, 2011.

- HENKEL R., HAJIMOHAMMAD M, STALF T, HOOGENDIK C, MEHNERT C, MENKVELD R, GIPS H, SCHILL WB, KRUGER TF. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. **Fertil Steril**, v.81, n.4, p.965-72, 2004.
- HOFFMANN N, OLDENHOF H, MORANDINI C, ROHN K, SIEME H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for sêmen from stallions that are classified “good” or “poor” for freezing. **Anim Reprod Scie**, v.125, p.112-118, 2011.
- JANUSKAUSKAS A, JOHANNISSON A, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Subtle membrane changes in cryopreserved Bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Therio**, v.60, p.743-758, 2003.
- KROEMER G, ZAMZAMI N, SUSIN SA. Mitochondrial control of apoptosis. **Immunol Today**, v.18, p.44-51, 1997.
- LOVE CC, THOMPSON JA, LOWRY VK, VARNER DD. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Therio**, v.57, p.1135-1142, 2002.
- LOVE CC. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Therio**, v.76, p.547-557, 2011.
- LOVE CC: The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. **Anim Reprod Scie**, v.89, p.39-45, 2005.
- MADRID-BURY N, PÉREZ-GUTIÉRREZ JP, PÉREZ-GARNELO S, MOREIRA P, SANJUANBENITO BP, GUTIÉRREZ-ADÁN A, MARTÍNEZ JF. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. **Therio**, v.64, p.232-241, 2005.
- MARTI E, PEREZ-PE R, COLAS C, MUINO-BLANCO T, CEBRIAN-PEREZ JA. Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. **Anim Reprod Sci**. v.106, p.113–132, 2008.
- MAZIERO, R.R.D., CRESPILO, A.C., FREITAS-DELL’AQUA, C.P., DELL’AQUA JUNIOR, J.A., PAPA, F.O. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **Rev Bras Reprod Anim**, supl.n.6, p.5-10, 2009.
- MORREL JM, JOHANNISSON A, DALIN AM, HAMMAR L, SANDEBERT T, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Vet Scand**, v.50, p.2, 2008.
- OEHNINGER S, DURU NK, SRISOMBUT C, MORSHEDI M. Assessment of sperm cryo-damage and strategies to improve outcome. **Mol. Cell. Endocrinol.** 169 (2000) 3-10.



PAPA FO, GABALDI SH, WOLF A. Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Rev Bras Reprod Anim**, v.24, p.39-44, 2000.

QUINTERO-MORENO A, RIGAU T, RODRIGUEZ-GIL JE. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. **Therio** 2004;61:673–90

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

SEVERO. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade **A Hora Veterinária** – Ano 28, nº 167, janeiro/fevereiro/2009

SILVA PFN, GADELLA BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Therio**, v.65, p.958-978, 2006

TOLLNER TL, DONG Q, VANDEVOORT C. Frozen-thawed rhesus sperm retain normal morphology and highly progressive motility but exhibit sharply reduced efficiency in penetrating cervical muçus and hyaluronic acid gel. **Cryobiol** v.62 p.15-21, 2011.

# Capítulo 5

## CONCLUSÕES GERAIS

1. Quando efetuadas diversas análises é possível identificar diferenças entre animais de alta e baixa fertilidade e que a associação destes marcadores com a fertilidade do sêmen apresentou um alto coeficiente de determinação o que pode reduzir as incertezas inerentes a previsão da fertilidade na avaliação *in vitro* do sêmen.

## CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

1. Espermatozóides eqüinos mantidos *in vitro* na temperatura ambiente apresentam uma queda progressiva do percentual de células móveis e entre 3 e 6 horas de estocagem demonstrando alterações semelhantes a capacitação e posteriormente diminuição dos parâmetros resultando em falência metabólica e acentuada morte celular.
2. Amostras seminais mantida sob refrigeração à 5°C por 24h foram melhor preservadas do que aquelas a 15°C. Pelo período de 12 horas não houve mas já apresenta marcadores da qualidade espermática que podem influir na fertilidade do sêmen
3. Há heterogenicidade entre as a mostras de sêmen; essas diferenças podem ser observadas através das análises; e é possível identificar amostras com maior potencia de fertilidade..

**Anexos**

**ANEXO 1 – SETUP CASA – HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12**

| <b>Características</b>               | <b>Ajuste</b>                    |
|--------------------------------------|----------------------------------|
| Números de frames                    | 30                               |
| Contraste mínimo                     | 60 pixels                        |
| Tamanho mínimo da célula             | 3 pixels                         |
| Contraste para células estáticas     | 30 pixels                        |
| Lineariedade                         | 80 %                             |
| Média mínima para VAP                | 30.0 $\mu\text{m}/\text{second}$ |
| Mínimo VAP para células progressivas | 70.0 $\mu\text{m}/\text{second}$ |
| Mínimo VSL para células lentas       | 20.0 $\mu\text{m}/\text{second}$ |
| Tamanho da cabeça estática           | 0.62 – 2,98                      |
| Intensidade da cabeça estática       | 0.24–1.19                        |
| Elongação cabeça estática            | 100–0                            |
| Magnificação                         | 1.95 $\times$                    |
| Temperatura                          | 37°C                             |

**ANEXO 2 – FÓRMULA TALP**

| <b>SPERM TALP</b>                                 |         |
|---|---------|
| Água destilada qsp                                | 500 mL  |
| KCl   | 0,932g  |
| MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O               | 0,085g  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O | 0,025g  |
| NaCl  | 2,100g  |
| Piruvato de sódio                                 | 0,055g  |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O               | 0,145g  |
| Lactato de sódio                                  | 1,550mL |
| HEPES   | 1,190g  |
| NaHCO <sub>3</sub>                                | 1,050g  |
| Gentamicina                                       | 0,250mL |

## ANEXO 3 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – ISSN 0102-5716

- **Artigos Científicos**

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens

### 1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, do lado direito da página. Digitá-los, separados um por linha, com **chamadas** de rodapé numeradas e em sobrescrito, **que indicarão** o cargo e o endereço profissional dos autores, seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação

### 2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, key words, e palabras-clave que identifiquem o conteúdo do texto.

### 3. A estrutura do artigo deverá conter:

**Introdução:** Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

**Material e Métodos:** Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

**Resultados:** Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. **Fotografias** podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o(s) nome(s) do(s) autor(es) no verso. No caso de **desenhos originais**, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade.

**Discussão:** Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

**Conclusões:** É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

**Referências:** Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).



## ANEXO 4 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA *JOURNAL EQUINE VETERINARY SCIENCE* – ISSN 0737-0806

### JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE - GUIDE FOR AUTHORS

#### INTRODUCTION

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

#### *Aims and Scope*

The *Journal of Equine Veterinary Science (JEVS)* is an international publication designed for the practicing equine veterinarian, equine researcher, and other equine health care specialist. Published monthly, each issue of *JEVS* includes original research, reviews, case reports, short communications, and clinical techniques from leaders in the equine veterinary field, covering such topics as laminitis, reproduction, infectious disease, parasitology, behavior, podology, internal medicine, surgery and nutrition. *JEVS* is also an official publication of the Equine Science Society.

#### *Types of contribution*

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Case Reports
4. Short Communications
5. Clinical Techniques

*Original Research:* Research or extensive clinical reports containing significant new findings. The material presented should be original and not have been published elsewhere, except in a preliminary form. Papers will be reviewed by referees familiar with the subject matter of the paper. Revisions are likely to be expected.

*Review Articles* should cover subjects falling within the scope of the journal, which are of active current interest. Papers need not contain original work or ideas. They will be reviewed for completeness, accuracy, style and suitability of content by referees familiar with the subject and the Editor-in-Chief. Revisions may be requested.

*Case Reports* are practitioner-oriented reports meant to communicate the facts of an interesting case or series of cases. Papers will be peer reviewed. Revisions are likely to be expected. The major concerns of the critique will be accuracy of diagnosis and relevance to equine practice.

*Short Communications* are intended to provide quick publication of highly relevant and interesting information. Manuscripts should contain original data and be limited to 2000 words. The number of tables and figures are limited to two each. A limited number of references should be included. Manuscripts will be peer reviewed by two reviewers and the Editor.

*Clinical Techniques* should describe a procedure or technique that must include 1) an overview and a description of the procedure; 2) a detailed series of images and descriptive text describing each step of the procedure; 3) a detailed description of the instruments and other materials needed to perform the procedure as well as trade name, manufacturer's name and address; 4) a summary or conclusion; and 5) references. Additional information acceptable for this section would include topics of current interest to our colleagues

whether it is a technique or subject that can be used in the clinical situation. "New drug regimens for use in the horse" is one example of such a clinical topic that has direct application to the equine.

#### *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/e/policy/b3.htm>; EC Directive 86/609/EEC for animal experiments [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](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 *Journal of Equine Veterinary Science*.

##### *Conflict of Interest*

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. 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 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 including electronically 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 of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (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.

#### *Disclosure*

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardize consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

#### *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. 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 you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

#### *Role of the Funding Source*

You are requested to identify who provided 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 the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see ⇨ <http://www.elsevier.com/funding>.

#### *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>.

#### *Sponsored Articles*

This journal offers authors the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please view our Sponsored Articles page at <http://www.elsevier.com/sponsoredarticles>.

#### *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://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

#### *Patent Details*

Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission. For further information see <http://www.elsevier.com/patientphotographs>.

#### *Submission*

Submission to this journal proceeds totally online and 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.

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/jevs>.

#### *Referees*

Please submit, as part of the covering letter with the manuscript, the names, full affiliation (department, institution, city and country) and email addresses of up to 5 potential Referees. Appropriate Referees should be knowledgeable about the subject but have no close connection with any of the authors. In addition, Referees should be from institutions other than (and preferably countries other than) those of 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. The Editors retain the right to choose reviewers as deemed appropriate. All submissions will be reviewed by at least two anonymous reviewers to evaluate them for originality, clear statement of a hypothesis, appropriate experimental design, completeness of methods, a logical and comprehensive discussion, and conclusions that are supported by data.

## **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. 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. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very 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 but, 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.

#### *LaTeX*

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>. The Elsevier "elsarticle" LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

#### *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 each heading.

##### Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. In most cases, this section should not exceed approximately 2 double-spaced pages.

##### Materials and Methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

##### Results

Results should be clear and concise, and should correspond to data collection as described in Materials and Methods.

##### Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

##### 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 Results and Discussion section.

##### Essential Title Page Information

*Title.* Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

*Author names and affiliations.* Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. 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 refereeing 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. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should 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 essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

#### 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"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.


#### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

#### Acknowledgements

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

#### *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 IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry:  <http://www.iupac.org/> for further information.

#### *Accession Numbers*

Accession numbers are unique identifiers in bioinformatics allocated to nucleotide and protein sequences to allow tracking of different versions of that sequence record and the associated sequence in a data repository [e.g., databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine ('GenBank') and the Worldwide Protein Data Bank]. There are different types of accession numbers in use based on the type of sequence cited, each of which uses a different coding. Authors should explicitly mention the *type of accession number together with the actual number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article. Please use the following format: accession number type ID: xxxx (e.g., MMDB ID: 12345; PDB ID: 1TUP). Note that in the final version of the *electronic copy*, accession numbers will be linked to the appropriate database, enabling readers to go directly to that source from the article.

#### *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).

#### *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.

#### *Image Manipulation*

Whilst it is 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.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, 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. DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

##### **Please do not:**

- Supply embedded graphics in your word processor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimized for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Non-Electronic Artwork*

Provide all illustrations as high-quality printouts, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Number illustrations consecutively in the order in which they are referred to in the text. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. Clearly mark all illustrations on the back (or - in case of line drawings - on the lower front side) with the figure number and the author's name and, in cases of ambiguity, the correct orientation.

Mark the appropriate position of a figure in the article.

#### *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. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. 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: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *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 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. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" 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 and the date when the reference was last accessed. 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.

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they 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* 2000;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

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; 1999, 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;277:927-934)(see also [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](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>.

#### Supplementary Material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ☞ <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data 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. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Files can be stored on diskette, ZIP-disk or CD (either MS-DOS or Macintosh).

#### Submission Checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author

- E-mail address
  - Full postal address
  - Telephone and fax numbers
  - All necessary files have been uploaded
  - Keywords
  - All figure captions
  - All tables (including title, description, footnotes)
  - Further considerations
  - Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked" 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://epsupport.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://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

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, for any reason, 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 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. Therefore, it is important to ensure that all of your 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 Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

#### *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 where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

*Updated November 2010*