

ALINE TAIANE ZIMMERMANN

**VALIDAÇÃO DO *PISUM ARVENSE* NA AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE
ACROSSOMAL EM ESPERMATOZOIDES DE RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa
Catarina - UDESC, como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alceu Mezzalira

**Lages, SC
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Zimmermann, Aline Taiane
Validação do *Pisum arvense* na avaliação da integridade
acrossomal em espermatozoides de ruminantes / Aline Taiane
Zimmermann. -- 2019.
51 p.

Orientador: Alceu Mezzalira
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2019.

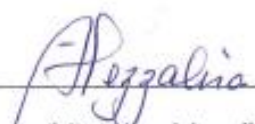
1. Espermatozoides. 2. Sêmen. 3. Acrossomo. 4. Sondas
fluorescentes. I. Mezzalira, Alceu. II. Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

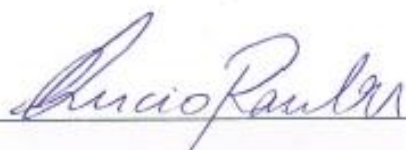
ALINE TAIANE ZIMMERMANN

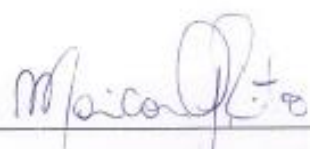
**VALIDAÇÃO DO *PISUM ARVENSE* NA AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE
ACROSSOMAL EM ESPERMATOZOÍDES DE RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador: _____

Prof. Dr. Alceu Mezzalana
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/CAV)

Membro: _____

Prof. Dr. Lúcio Pereira Rauber
Instituto Federal Catarinense (IFC – Concórdia/SC)

Membro: _____

Dr. Maicon Gaißler Lorena Pinto
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI – Lages SC)

Lages, 22 de março de 2019

AGRADECIMENTOS

De forma breve gostaria de registrar aqui meus agradecimentos a grandes pessoas que fizeram parte da conclusão de mais uma importante etapa.

Agradeço primeiramente a Deus, e aos meus pais, que na sua humildade me ensinaram os valores do ser humano. Que durante toda a vida deixaram de lado suas aspirações e seus sonhos para poder me proporcionar à possibilidade de trilhar um futuro melhor.

Gostaria de agradecer ao meu amado marido que está comigo em todos os momentos.

Ao meu orientador Professor Alceu Mezzalira, que me acolheu no momento em que mais precisei e não mediu esforços para me ajudar durante o desenvolvimento do projeto. Obrigada por todas as conversas.

A todos os colegas do Laboratório de Reprodução Animal Professor Assim Roberto de Bem do CAV/UDESC, que foram o pilar fundamental para o desenvolvimento deste trabalho e em nenhum momento deixaram de contribuir com o conhecimento técnico necessário. Estes colegas se tornaram amigos e ficarão sempre guardados no coração.

Ao Sr. Paulo Gregianin, gerente da fazenda Pinheiro Seco por disponibilizar os animais e possibilitar a realização do experimento. Gostaria de agradecer também a pessoa do senhor Rodrigo Bainy Leal que disponibilizou o material do estudo.

Enfim, agradeço a cada um que de alguma forma me auxiliou nesta conquista.

RESUMO

ZIMMERMANN, Aline. T. **Validação do *Pisum arvense* na avaliação da integridade acrossomal em espermatozoides de ruminantes.** 2019, 51 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2019.

A inseminação artificial é uma importante biotécnica de reprodução, sendo a avaliação do sêmen primordial para garantir bons índices reprodutivos. Rotineiramente, são observados parâmetros como motilidade, concentração, vigor e movimento de massa, além outras análises que buscam antever com maior exatidão a qualidade e o desempenho do sêmen *in vivo*. Neste contexto, a avaliação do acrossomo tem ganhado importância nas pesquisas. O uso de sondas fluorescentes vem sendo empregado nesta avaliação, com destaque para a FITC/PSA (Sigma L0770), que é comercializado por uma empresa multinacional. Recentemente foi demonstrado a possibilidade da utilização da proteína do *Pisum arvense* com a mesma finalidade. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi validar o emprego de *Pisum arvense* (FITC/PLA) na avaliação da reação acrossomal em células espermáticas de ovinos e bovinos. Utilizou-se sêmen ovino, fresco, resfriado e congelado e sêmen bovino congelado. As amostras foram avaliadas quanto a motilidade, vigor, turbilhão e concentração, sendo empregados apenas os ejaculados com mais de 70% de motilidade e critérios de viabilidade do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Após as análises iniciais foram confeccionados os esfregaços e adicionadas as sondas fluorescentes. As lâminas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência, sendo avaliadas 200 células, classificadas de acordo com a coloração do acrossomo em intactas ou lesionadas. Os dados relativos ao percentual de acrossomos intactos obtidos com os dois tratamentos foram submetidos a teste de normalidade dos resíduos e análise de variância (ANOVA). Não houve diferença estatística entre os tratamentos. O percentual de acrossomos íntegros nos grupos de sêmen ovino fresco, resfriado e congelado, diferiram pelo teste de Tukey. Foi realizada regressão linear simples entre motilidade e percentual de acrossomos íntegros, sendo observado uma correlação positiva nas amostras de sêmen ovino ($r^2=0.7145$). Todas as avaliações tiveram nível de significância de 5%. Conclui-se que o FITC/PLA tem a mesma eficiência do FITC/PSA para mensurar a reação acrossomal de sêmen de carneiros e touros.

Palavras-chave: Espermatozoide, Sêmen, Acrossomo, Sondas Fluorescentes.

ABSTRACT

ZIMMERMANN, Aline. T. **Validation of the *Pisum arvense* to assess acrosome integrity in ruminant spermatozoa.** 2019, 51p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Lages, 2019.

The artificial insemination is an important reproductive biotechnology, and semen evaluation is essential to assure adequate reproductive efficiency. Routinely, parameters such as motility, concentration, vigor and mass movement are observed, as well as other analyzes that seek to more accurately predict the quality and performance of semen *in vivo*. In this context, the acrosome evaluation has gained importance. The fluorescent probes has been used in this evaluation, with emphasis on FITC/PSA (Sigma L0770), which marketed of a multinational company. Recently it was demonstrated the possibility of to use the *Pisum arvense* protein with the same purpose. In this way, the aim of this study was to validate the use of *Pisum arvense* (FITC/PLA) in the acrosome evaluation of ovine and bovine spermatozoa. Ram fresh, cooled and frozen semen, and bovine frozen semen were used in the study. The samples were evaluated by parameters as motility, vigor, mass movement, and concentration. Only ejaculates with more than 70% motility and viability criteria according Brazilian College of Animal Reproduction were used. After the initial analyzes the semen smears were performed, and the fluorescent probes added. The slides were analysed under an epi-fluorescent microscope, where 200 cells were classified according to the acrosome staining, as intact or damaged acrosome. Data were submitted to the normality test of the residues and analysis of variance (ANOVA). There was no statistical difference between treatments. The means of intact acrosome in groups of fresh, cooled and frozen ram semen showed a significant difference by Tukey test. It was performed a linear regression between sperm motility and intact acrosome, being observed a positive correlation in rams semen groups ($r^2=0.7145$). All evaluations had significance level of 5 %. We concluded that the FITC/PLA has the same efficiency of the FITC/PSA to evaluate the acrosome reaction of rams and bull's semen.

Keywords: Sperm, Semen, Acrosome, Fluorescent Probes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação gráfica da interação dos gametas.....	25
Figura 2- Espermatozoide permeabilizado marcado com o uso de FITC/PSA (1) e com o FITC/ PLA (2)	40
Figura 3- Caracterização do acrossomo de células espermáticas permeabilizadas pelo padrão de fluorescência apresentado.....	41
Gráfico 1- Regressão linear simples da motilidade e percentual de acrossomo íntegro em células espermáticas de ovinos.....	43
Gráfico 2- Percentual de acrossomos íntegros marcados com as sondas fluorescentes FITC/PSA (controle) e FITC/PLA (tratamento) em células espermáticas fixadas e permeabilizadas de bovinos.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Percentual de acrossomo marcado íntegro, com o uso de FITC/PSA (controle) e FITC/PLA (tratamento), nas três formas de conservação de sêmen ovino (fresco, resfriado e congelado).....

42

LISTA DE ABREVIATURAS

CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
ZP	Zona Pelúcida
PLA	<i>Pisum Arvense</i> Lecitina
PSA	Aglutinina de <i>Pisum Sativum</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
IA	Inseminação Artificial
MP	Membrana Plasmática

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA CÉLULA ESPERMÁTICA	21
2.1.1	O acrossomo	23
2.1.1.1	<i>A capacitação acrossomal.....</i>	23
2.1.1.2	<i>Reação acrossomal.....</i>	24
2.2	AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE E INTEGRIDADE DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS	25
2.2.1	Espermograma.....	26
2.2.1.1	<i>Coleta do sêmen</i>	26
2.2.1.2	<i>Aspecto do sêmen</i>	27
2.2.1.3	<i>Volume do ejaculado.....</i>	27
2.2.1.4	<i>Turbilhão ou movimento de massa.....</i>	27
2.2.1.5	<i>Motilidade progressiva.....</i>	28
2.2.1.6	<i>Vigor.....</i>	28
2.2.1.7	<i>Concentração</i>	28
2.2.1.8	<i>Morfologia espermática</i>	28
2.2.1.9	<i>Padrões mínimos para ruminantes.....</i>	29
2.2.1.10	<i>Avaliações complementares</i>	29
2.3	AS SONDAS FLUORESCENTES	30
3	CAPÍTULO 1. VALIDAÇÃO DO PISUM ARVENSE NA AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE ACROSSOMAL EM RUMINANTES	35
3.1	RESUMO	35
3.2	INTRODUÇÃO.....	35
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.3.1	Reagentes /Corantes	37
3.3.2	Amostras de sêmen	37
3.3.3	Avaliação e processamento do sêmen	38
3.3.4	Confecção e avaliação das lâminas	38
3.3.5	Análise estatística	39
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.5	CONCLUSÃO.....	47

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
----------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

A utilização de novas biotecnologias ligadas à reprodução é uma realidade frequente em todos os ramos produtivos da pecuária. Como esta atividade apresenta importância econômica, por ser parcela significativa das exportações do País, a reprodução é parte fundamental do sistema, já que dela resultam todos os produtos que constituem a cadeia produtiva. Assim, todas as biotecnologias implementadas visam amplificar os índices nas etapas subsequentes. A possibilidade de manipular a reprodução animal contribui para potencializar o ganho genético dos rebanhos e aumentar a sua produtividade. Porém quando executadas de forma inadequada, podem produzir efeitos negativos, que resultam em grandes perdas econômicas.

Neste contexto a inseminação artificial (IA) aparece como a mais importante ferramenta de melhoramento genético, sendo de fácil aplicação e com frequente utilização de sêmen criopreservado, possibilitando assim o intercâmbio de material genético. Porém a manipulação durante o processamento do sêmen pode desencadear alterações físicas e químicas nas células espermáticas, comprometendo suas características funcionais como a motilidade e estrutura das membranas, diminuindo sua viabilidade e a sua capacidade fecundante. Para garantir bons índices na utilização das biotecnologias da reprodução um dos passos fundamentais é a avaliação do sêmen.

Na avaliação do sêmen, existem várias características que devem ser analisadas, sendo cada uma delas de alguma forma relacionada com a fertilidade. Uma das avaliações realizadas é a integridade acrossomal. O acrossomo possui enzimas que estão relacionadas com a capacidade de ligação do espermatozoide com o oócito, interferindo assim no processo de fecundação seja *in vivo* ou *in vitro*.

Nos últimos anos foram disponibilizadas as sondas fluorescentes, como forma de avaliar o acrossomo, tanto na forma subjetiva direta, quanto através de sistemas computadorizados. Os reagentes empregados para esta técnica são importados, com alto valor agregado e mantendo uma dependência de grandes empresas multinacionais, o que torna a técnica dispendiosa. Neste contexto seria importante o desenvolvimento destas sondas no Brasil, o que poderia reduzir os custos do processo e aumentar o seu acesso, tanto na pesquisa, como na utilização comercial.

Este estudo tem como objetivo validar a utilização da lectina presente na *Pisum arvense* associado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC/PLA) na marcação da reação acrossomal de espermatozoides de ruminantes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DA CÉLULA ESPERMÁTICA

Os espermatozoides são células altamente especializadas formadas no interior dos túbulos seminíferos dos testículos, a partir de células germinativas (GARNER e HAFEZ, 2004). Os túbulos seminíferos contêm as células de Sertoli, que fornecem o microambiente necessário para a espermatogênese (REICHENBACH et al., 2008), além de proporcionar a migração da célula desde a membrana basal até o lúmen do túbulo. O processo de espermatogênese envolve basicamente três etapas distintas, sendo elas a espermatogoniogênese, a espermatocitogênese e a espermiogênese. Nas duas primeiras ocorre basicamente o processo de divisão e multiplicação celular e na última as transformações morfológicas e estruturais da espermátide, formando o espermatozoide (REICHENBACH et al., 2008). O controle hormonal da espermatogênese envolve a participação de três hormônios sendo eles, o LH que estimula as células de Leyding dos testículos a secretarem testosterona e o FSH que estimula a produção de andrógenos ligados a proteínas (ABP) e inibina pelas células de Sertoli (REICHENBACH et al., 2008).

Os principais componentes químicos dos espermatozoides são os ácidos nucleicos, as proteínas e os lipídeos (GARNER e HAFEZ, 2004). A maior parte dos lipídeos nos espermatozoides são fosfolipídios presentes na membrana plasmática que participam de vários eventos metabólicos, como mudanças químicas associadas com a maturação, capacitação e preservação da membrana plasmática (GONZÁLEZ, 2002). O espermatozoide é coberto pela membrana plasmática (GARNER e HAFEZ, 2004) que apresenta características especiais, quando comparada a das células somáticas (FLESCH e GADELLA, 2000). A membrana plasmática da célula espermática passa por diversas modificações e reorganizações, demonstrando ser uma estrutura bastante dinâmica para possibilitar a fecundação.

A célula espermática madura apresenta basicamente três regiões distintas: a cabeça, estrutura que está relacionada com a interação do espermatozoide e o oócito; a peça intermediária, onde estão localizadas as mitocôndrias responsáveis por fornecer energia à célula, e o flagelo, parte móvel que garante a capacidade de movimentação da célula (FLESCH e GADELLA, 2000). A cabeça dos espermatozoides tem forma oval para a maioria

dos mamíferos (GONZÁLEZ, 2002), sendo que no seu interior está localizado o núcleo responsável pelo armazenamento do material genético, que é recoberto pelo acrossomo (REICHENBACH et al., 2008).

Os espermatozoides, quando completamente desenvolvidos, apresentam-se com uma estrutura alongada (GARNER e HAFEZ, 2004). Estas células permanecem imóveis nos testículos, e são incapazes de ligar-se a zona pelúcida e fertilizar o óvulo (ABOU- HAILA e TULSIANI, 2000). A medida que são produzidos, os espermatozoides são transportados dos testículos para o epidídimo, onde as células encontram um ambiente com condições favoráveis para a maturação, que envolve a capacidade de adquirir motilidade e capacidade fecundante (REICHENBACH et al., 2008).

O espermatozoide tem características celulares únicas, sendo capaz de se movimentar e fecundar, sendo que para isso apresenta funções bioquímicas especiais, como a capacidade de produzir a energia necessária para a motilidade (GONZÁLEZ, 2002). A função primordial da célula espermática é realizar a fecundação, gerando um zigoto competente. Para tanto, cada espécie apresenta características totalmente adaptadas, com divergências quanto ao tipo de proteínas espermáticas envolvidas na fertilização, forma de espermatozoide, composição de plasma seminal, número de espermatozoides produzidos por ejaculado e seu volume total (GADELLA e LUNA, 2014).

O plasma seminal é conhecido por manter a estabilidade da membrana plasmática do esperma, ajudando a evitar modificações a nível celular semelhante à capacitação ou exocitose acrossômica que torna o espermatozoide infértil (BALLESTER et al., 2006). Assim, à medida que os espermatozoides migram pelo trato genital da fêmea, e o plasma seminal é perdido ocorrem fisiologicamente alterações complexas nas membranas (FLESCHE e GADELLA, 2000), especialmente a capacitação.

Para ter sucesso na concepção a célula espermática deve apresentar membrana funcional, além de acrossomo e DNA intactos e função mitocondrial (FARAH et al., 2013). O processamento das amostras de sêmen altera a estrutura das membranas dos espermatozoides, podendo influenciar a capacidade de fertilização do sêmen (GADELLA, 2008). Neste contexto, o acrossomo aparece como peça fundamental para a concepção.

2.1.1 O acrossomo

O acrossomo é uma estrutura derivada do complexo de Golgi, formado durante a espermatogênese (FLESCH e GADELLA, 2000). É uma vesícula localizada na parte anterior da cabeça do espermatozoide (KOPF e GERTON, 1991), contendo no seu interior acrosina, hialuronidase e outras enzimas hidrolíticas (GARNER e HAFEZ, 2004), sendo uma estrutura essencial para a fertilização (YÀNIZ et al., 2014). A hialuronidase dispersa as células do cumulus que envolvem o óvulo, enquanto a proacrosina, precursora da acrosina, ajuda na penetração através da zona pelúcida (ZP) (GONZÁLEZ, 2002). O acrossomo é dividido em três regiões distintas, sendo elas a apical, a intermediária e a equatorial (REICHENBACH et al., 2008).

O processo de fertilização é complexo, já que para estar apto a fecundar o espermatozoide deve passar por várias modificações, incluindo a capacitação e a reação acrossomal para possibilitar a penetração na zona pelúcida e a fusão com o oócito (YANAGIMACHI, 1994). A perda prematura do acrossomo pode resultar em subfertilidade (FENICHEL et al., 1991).

2.1.1.1 A capacitação acrossomal

O processo de capacitação compreende uma sequência complexa de eventos de reorganização e modificação da estrutura da membrana da célula espermática no trato reprodutivo da fêmea, que possibilita ao espermatozoide ligar-se à ZP (FLESCH e GADELLA, 2000). A capacitação parece ser um processo de seleção dos melhores espermatozoides para fertilizar, sendo que o tempo necessário para o processo é em média de 4 a 6 horas, variando entre as espécies (GONZÁLEZ, 2002). Os mecanismos moleculares envolvidos nas mudanças funcionais da membrana durante a capacitação não são totalmente esclarecidos (ABOU- HAILA e TULSIANI, 2000), mas eles podem ser simulados em laboratório para a fertilização *in vitro* (GADELLA, 2008).

Durante a passagem do espermatozoide através do útero, grande parte do revestimento extracelular da célula é removido, incluindo os fatores que bloqueiam a capacitação e que estão presentes no plasma seminal (GADELLA, 2008). A decapacitação funciona como um bloqueador para impedir a ativação prematura do acrossomo (HAFEZ e HAFEZ, 2004) e a degradação da célula. Ballester et al. (2006) em estudo com sêmen bovino e constataram que

quando as células se encontravam em reduzida concentração de plasma seminal, os espermatozoides vivos apresentavam uma proporção significativamente maior de acrossomos reagidos.

A reorganização da superfície da célula espermática ocorre quando está próxima ao óvulo, adquirindo então a capacidade para fecundar (GADELLA, 2008). Dentre as modificações sofridas pela membrana durante a capacitação, estão incluídas a depleção do colesterol na superfície espermática, alteração nos glicosaminoglicanos e mudança nos íons (HAFEZ e HAFEZ, 2004). As modificações estruturais culminam com o fluxo transmembrana de íons que, acredita-se ser um passo importante para iniciar a capacitação (ABOU- HAILA e TULSIANI, 2000). As células espermáticas encontram no trato reprodutivo um ambiente altamente rico em bicarbonato (GADELLA, 2008), substância que parece desempenhar papel fundamental no processo de capacitação.

Durante o processo de capacitação e a ligação a ZP os espermatozoides passam a apresentar hipermotilidade (FLESCH e GADELLA, 2000). Esse movimento intenso e vigoroso da célula facilita a penetração no oócito. Juntos, o processo de capacitação e a hiperativação, permitem que o espermatozoide se ligue na ZP, desencadeando o processo de reação acrossomal (GADELLA, 2008).

2.1.1.2 Reação acrossomal

A reação acrossomal é caracterizada pela exocitose do conteúdo enzimático do acrossomo, que ocorre pela fusão da membrana plasmática e a membrana acrossomal externa. (GARNER e HAFEZ, 2004). O processo de reação acrossomal promove alterações estruturais e funcionais na célula, e a partir deste momento o espermatozoide adquire a capacidade de penetrar na ZP (CROSS e MEIZEL, 1989). Compreender o processo de reação acrossomal é fundamental para entender a função do espermatozoide (CROSS e MEIZEL, 1989). O acrossomo deve permanecer intacto durante o transito do espermatozoide no trato reprodutivo, até a ligação à ZP (SILVA e GADELLA, 2006), caso contrário parte do conteúdo necessário para a penetração será perdido (FLESCH e GADELLA, 2000) tornando o espermatozoide inapto para a penetração (SILVA e GADELLA, 2006). A interação do espermatozoide com o óvulo é mediada por carboidratos específicos em cada espécie e é iniciada por um sinal resultante da exocitose de conteúdo acrossomal.

Figura 1- Representação gráfica da interação dos gametas

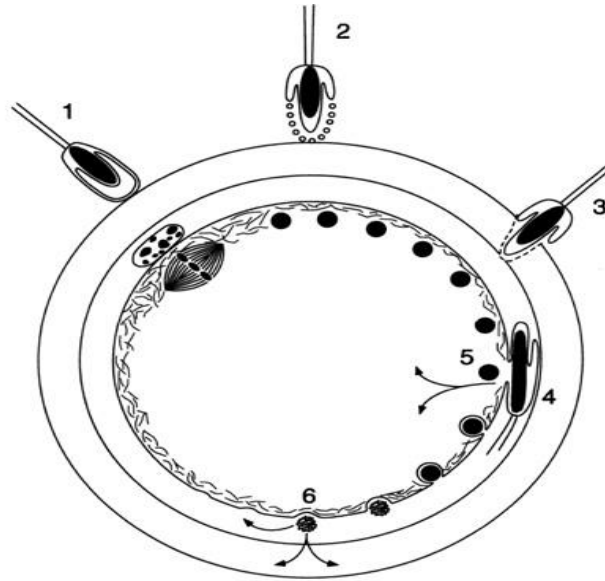


Figura 1. Esquema representativo da interação espermatozoide e oócito. 1- ligação do espermatozoide capacitado a ZP, 2- reação do acrossomo, 3- penetração na ZP.

FONTE: GADELLA (2008)

Entender a biologia da superfície dos espermatozoides e sua dinâmica pode projetar estudos que melhorem os procedimentos de manipulação de espermatozoides, trazendo incontáveis benefícios para as tecnologias da reprodução animal (GADELLA e LUNA, 2014). O processo de congelamento e descongelamento afeta negativamente a integridade do acrossomo (NUR et al., 2010). Células com defeito de acrossomo ou que apresentam reação acrossomal prematura são um forte indicador de subfertilidade. Maiores taxas de prenhez são obtidas quando é empregado na IA amostras que apresentam membranas plasmática e acrossomal intacta e alta função mitocondrial (OLIVEIRA et al., 2014). Em estudo realizado, Sukard et al. (1997), sugerem que, após a reação acrossomal, a célula espermática permanece viável por um período de duas a quatro horas. Isso ressalta a importância de avaliar a integridade do acrossomo, antes do emprego das amostras em técnicas de reprodução assistida (SILVA e GADELLA, 2006).

2.2 AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE E INTEGRIDADE DAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS

O melhor método para avaliar sua capacidade reprodutiva é, sem dúvida, mensurar a fertilidade de um macho através da taxa de prenhez obtida com o uso da IA ou monta natural.

Porém, este é um processo demorado e que apresenta um alto valor agregado. Assim, vários métodos laboratoriais foram desenvolvidos nos últimos anos na busca por prever a capacidade fecundante do sêmen (LARSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000). Estes métodos podem ser usados separadamente, ou em associação tentando sempre prever, com maior confiança, o processo *in vivo* (ARRUDA et al., 2010). Análises laboratoriais, como viabilidade, motilidade e reação acrossomal, podem ser usadas para estimar a fertilidade, porém a maioria destas avalia apenas um parâmetro por vez (OZAKI et al., 2002), sendo que a avaliação de somente um atributo espermático não garante a condição de normalidade dos demais (LARSSON e RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2000). Os índices de fertilidade *in vivo* e os parâmetros observados nas análises laboratoriais ainda são variáveis. Quando diversos métodos são combinados, podemos ter uma maior precisão na estimativa da fertilidade nas amostras de sêmen (FREITAS-DELL' AQUA et al., 2009). O conjunto de avaliações realizadas em uma amostra de sêmen é denominado espermograma.

2.2.1 Espermograma

A fertilidade de um macho está relacionada a vários fenômenos como a produção, a viabilidade e capacidade fertilizante dos espermatozoides ejaculados (JAINUDEEN e HAFEZ, 2004). O espermograma é apenas uma parte do exame andrológico e busca prever a capacidade fecundante da amostra de sêmen. O sêmen é constituído basicamente de plasma seminal e espermatozoides (REICHENBACH et al., 2008). O reprodutor infértil é rapidamente identificado, porém aquele com fertilidade reduzida representa graves problemas e ocasiona perdas econômicas para os criadores e para a indústria da IA (JAINUDEEN e HAFEZ, 2004) e podem passar despercebidos. Neste contexto, é expressa a importância da avaliação das amostras. A análise de sêmen para diversas espécies está baseada na técnica de microscopia, onde são avaliados parâmetros como motilidade, vigor, concentração e morfologia (FREITAS-DELL' AQUA et al., 2009).

2.2.1.1 Coleta do sêmen

Para a coleta do sêmen pode ser utilizado vagina artificial, eletroejaculação, massagem retal das glândulas anexas, coleta no fundo de saco vaginal e mão enluvada, sendo que a escolha do método depende da espécie a ser coletada (CBRA, 2013). Amostras de sêmen coletadas com eletroejaculador apresentam maior contaminação (bactérias, células de descamação, urina) e menor concentração, portanto são de pior qualidade, quando

comparadas aquelas obtidas com vagina artificial (OHASHI, 2001). O uso da vagina artificial simula as condições fisiológicas e assemelha-se à monta natural, permitindo que o animal ejacule naturalmente (HAFEZ; HAFEZ, 2004), sendo este o método mais indicado. Uma colheita adequada, respeitando as características fisiológicas da espécie, é o primeiro passo para o sucesso no processamento do sêmen (OHASHI, 2001).

2.2.1.2 Aspecto do sêmen

Ao exame visual, o aspecto do sêmen envolve a avaliação da aparência e permite uma avaliação subjetiva da concentração (REICHENBACH et al., 2008) e pode ser classificada em cremosa, leitosa, serosa ou aquosa (CBRA, 2013). A cor varia de acordo com a espécie e pode ser branco, marfim, acinzentado ou amarelo citrino (CBRA, 2013). Cores anormais como amarelo esverdeado pode ser indicativo de pus ou urina, ou até mesmo de azoospermia. Já quando a cor é avermelhada, sugere a presença de sangue na amostra (REICHENBACH et al., 2008). Segundo CBRA (2013) para bovinos e ovinos a cor normal é branca ou amarelo-marfim. Na avaliação sensorial, o odor é característico, sendo que sua modificação pode sugerir a presença de urina ou processos infecciosos (REICHENBACH et al., 2008).

2.2.1.3 Volume do ejaculado

O volume varia de acordo com o método de coleta utilizado, do regime de serviço e da estimulação previa à coleta e varia entre 0,5 - 3 mL para ovinos e de 5 - 8 mL para bovinos (CBRA, 2013). O volume também pode sofrer influência da idade, raça, bem como variações individuais, conforme a condição de ambiente e manejo (REICHENBACH et al., 2008).

2.2.1.4 Turbilhão ou movimento de massa

Este movimento é observado em ruminantes e é caracterizado por um movimento em forma de ondas, determinado pela motilidade, vigor e concentração espermática. Para sua avaliação, uma amostra de sêmen 10 μ L deve ser depositada sobre uma lâmina previamente aquecida (37°C) e observado ao microscópio óptico utilizando aumento de 100x. O turbilhão é avaliado de forma subjetiva em uma escala de 0 a 5, sendo 0 total ausência de movimento e 5 acentuado movimento, conforme o CBRA (2013).

2.2.1.5 Motilidade progressiva

Avaliação subjetiva estimada através da observação do percentual de espermatozoides móveis em movimento progressivo em pelo menos três campos de uma lâmina, previamente aquecida a 37°C, sendo determinado o percentual de espermatozoides com motilidade progressiva, conforme o CBRA (2013). Nesta avaliação deve-se excluir os espermatozoides com movimentos circulares e vibratórios (OHASHI, 2001). Quando a concentração espermática for muito alta, a amostra deve ser previamente diluída (REICHENBACH et al., 2008).

2.2.1.6 Vigor

Representa à intensidade do movimento progressivo das células, a avaliação é realizada após a análise da motilidade. O vigor será representado por uma escala de 1-5 sendo 1 deslocamento lateral fraco e inexpressivo e 5, movimento progressivo retilíneo vigoroso e veloz, conforme CBRA (2013).

2.2.1.7 Concentração

A concentração representa o número de espermatozoides existentes em 1 mL da amostra. A contagem pode ser feita através da câmara de Neubauer, espectrofotometria ou métodos computadorizados (CBRA, 2013). A concentração varia principalmente em função do método de coleta, mas pode variar conforme a frequência da coleta, a época, a raça e o estado nutricional do indivíduo (REICHENBACH et al., 2008).

2.2.1.8 Morfologia espermática

Normalmente é aceitável que o ejaculado apresente certo percentual de células com defeitos de morfologia. Porém, acima de determinados níveis, estas patologias podem comprometer os resultados ou inviabilizar a criopreservação (NEVES et al., 2008). Para a avaliação morfológica pode ser utilizado esfregaço corado ou preparação úmida. As anormalidades de morfologia podem ser classificadas em defeitos maiores ou menores, primários ou secundários ou ainda levando em consideração o segmento da célula afetado (CBRA, 2013). Os defeitos maiores são consequências de anomalias ao nível do testículo e epidídimo, e podem comprometer seriamente a fertilidade, o importante é que os defeitos, principalmente de cabeça e peça intermediária, não ultrapassem a 5%, para não prejudicar a

taxa de concepção (SILVA et al., 1993). Os defeitos menores têm menor importância, não estando diretamente relacionados a processos patológicos dos testículos sendo que parte deles pode ser adquirida durante a permanência e a passagem dos espermatozoides pelas vias espermiáticas (REICHENBACH et al., 2008). Deve ser levado em consideração o aparecimento de defeitos individuais, sendo que não deve ultrapassar 5 % de maiores e 10 % de menores (CBRA, 2013). O total de anormalidades de células espermiáticas em um ejaculado é o resultado dos defeitos maiores e menores (SILVA et al., 1993).

A classificação em defeitos primários ou secundários está baseada na origem dos defeitos, sendo os primários oriundos da espermiogênese e os secundário advém de afecções dos epidídimos, vias espermiáticas, glândulas anexas e ainda da manipulação ou processamento da amostra de forma inadequada (REICHENBACH et al., 2008).

2.2.1.9 Padrões mínimos para ruminantes

O CBRA (2013) estabelece as características seminais um padrão mínimo para amostras ovinas um volume mínimo do ejaculado de 0,5 mL; movimento de massa de ≥ 3 ; vigor ≥ 3 ; motilidade espermiática $\geq 80\%$; concentração mínima de espermatozoides $1-3 \times 10^9$ células/mL e um percentual de células normais maior que 80%. Já para bovinos os parâmetros mínimos são volume do ejaculado de 5 – 8 mL; movimento de massa de ≥ 3 ; vigor ≥ 3 ; motilidade espermiática $\geq 60\%$; concentração mínima de espermatozoides 350×10^6 células/mL e um percentual de células normais maior que 70%.

2.2.1.10 Avaliações complementares

O processo de fertilização é complexo e envolve diversos eventos bioquímicos e fisiológicos da célula que não podem ser medidos exclusivamente pela avaliação de rotina do sêmen (NUR et al., 2010). A avaliação da integridade da membrana plasmática é importante indicador de qualidade das amostras seminais, uma vez que os espermatozoides não são capazes de restaurá-las (NEVES et al., 2008). Para que a célula espermiática possa realizar a fecundação ela deve ter a capacidade de responder aos estímulos externos e sofrer as modificações necessárias.

A utilização de biotécnicas de reprodução animal tem ganhado espaço no sistema produtivo e possibilita a utilização de sêmen criopreservado. Durante o processo de

congelamento e descongelamento do sêmen cerca de 10 a 50% dos espermatozoides não resistem ao processo e morrem. Este percentual varia em função da qualidade do ejaculado e dos métodos de manipulação (OHASHI, 2001). O processo de criopreservação é adverso para a célula espermática e pode promover alterações de membrana, semelhante ao que ocorre durante a capacitação espermática (CORMIER et al., 1997). Em revisão bibliográfica, Gadella (2008) reforça a necessidade de levar em consideração que o processo de armazenamento de sêmen altera a estrutura espermática, o que acaba influenciando diretamente a sua viabilidade e capacidade de fertilização.

Buscando mensurar com maior precisão a capacidade de fertilização, novas análises são aprimoradas e/ou desenvolvidas. Métodos adequados para analisar a condição acrossomal ainda não estão estabelecidos para todas as espécies. Todavia, os métodos existentes, quando utilizados de maneira consciente, geram importantes informações sobre a qualidade do sêmen (CROSS e MEIZEL, 1989). Existem várias formas de avaliar o acrossomo, onde destaca-se o uso de microscopia de contraste de fase em preparações úmidas e a confecção de esfregaços corados. Yániz et al. (2014) destaca que o estudo da morfometria do acrossomo é extremamente importante, sendo necessária para sua análise uma clara distinção entre as estruturas da célula, o que não é possível utilizando métodos e microscópios convencionais. Em função das dificuldades apontadas, a avaliação da viabilidade espermática e a perda acrossomal espontânea ou induzida, têm sido realizadas com o uso de sondas fluorescentes (SUKARD et al., 1997). A descoberta de sondas fluorescentes tem permitido uma análise das características espermáticas de forma mais ampla (FREITAS DELL' AQUA et al., 2009).

2.3 AS SONDAS FLUORESCENTES

As sondas fluorescentes são utilizadas isoladamente ou em associação para determinar a integridade e a funcionalidade de organelas dos espermatozoides ou seus compartimentos. Estas sondas possuem a capacidade de ligar-se a pontos específicos das células, diferindo assim dos corantes, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto. Com o uso de sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência, ou citometria de fluxo, pode-se avaliar, por exemplo, a integridade de membranas plasmática e acrossomal, o potencial mitocondrial, o índice de fragmentação de DNA e a reação acrossomal, entre outros (ARRUDA et al., 2011).

A determinação da condição acrossomal de forma direta fica restrita a poucas espécies, por exemplo em camundongos. Para avaliação de sêmen da grande maioria das espécies foram desenvolvidos outros métodos, que incluem o uso de sondas fluorescentes (CROSS e MEIZEL, 1989). O uso de sondas fluorescentes para avaliação da condição acrossomal foi utilizada em diversos estudos com diferentes espécies, incluindo gatos domésticos (VILLAVERDE et al., 2013), caninos (BENCHARIF et al., 2010), bovinos (JANKOVICOVÁ et al., 2006), equinos (AFFONSO et al., 2017), suínos (SCHULZE et al., 2017), ovinos (NUR et al., 2010) e também em humanos (ZOPPINO et al., 2012). Sukard et al. (1997) utilizando sêmen de ovinos destacou a importância de realizar a avaliação da célula espermática, tanto para demonstrar a viabilidade, como para caracterizar o *status* acrossomal.

Existem duas classes de sondas fluorescentes para avaliar a reação acrossomal. Uma é capaz de detectar elementos intracelulares, sendo necessário que a célula esteja permeável, enquanto a outra pode ser usada em células não permeabilizadas (GARCIA, 2005). Na primeira classe estão as lectinas e os anticorpos intracelulares, e na segunda categoria está a clortetraciclina e anticorpos com exposição externa de antígenos (CROSS e MEIZEL, 1989). A entrada da sonda em uma célula e sua reação com sítios de afinidade intracelular, depende de múltiplos fatores, como permeabilidade da membrana, presença de sítios de ligação competitivos e a presença de ligantes intracelulares competitivos que reagem com os sítios de afinidade de interesse (MENDOZA et al., 1992).

Cross e Meizel (1989) relatam que a primeira sonda usada foi o isotiocianato de fluoresceína (FITC) associada a *Ricinus communis* aglutinina, que em função da toxicidade, acabava demandando cuidado na sua manipulação. Sendo por isso, substituída por outras como a *Pisum Sativum* aglutinina (PSA) e Peanut aglutinina (PNA), ambas lectinas. Desde que estejam disponíveis, as lectinas ligam-se a glicoproteínas do grupo sacarídeo, que são encontradas em várias células animais não sendo necessariamente confinada ao acrossomo. Porém, é observada uma ligação mais seletiva aos conteúdos acrossomais (MENDOZA et al., 1992). A lectina apresenta uma afinidade para os resíduos terminais alfa-D-glucosil e alfa-D-manosil de glicoproteínas (TROWBRIDGE, 1974). O FITC/PSA é usado para avaliar a condição do acrossomo, já que marca as glicoproteínas presentes nesta estrutura, em células permeabilizadas (SUKARD et al., 1997). Em estudo onde avaliaram a efetividade de lectinas em marcar a reação acrossomal, Cross e Watson (1994) concluíram que o uso de PSA em células espermáticas fixadas é um ensaio rápido e preciso. Valcárcel et al. (1997) concluíram

que a avaliação do *status* acrossomal de espermatozoides de carneiro por ligação com a lectina é uma técnica rápida, confiável e altamente reprodutível e que pode ser usada para o acompanhamento de procedimentos reprodutivos *in vitro*.

Segundo Cross e Meizel (1989), em alguns casos pode haver dificuldade de classificar o espermatozoide em reagido ou intacto, mas isso não é um grande problema, pois células com estas características são minoria se comparadas com as de fácil classificação. Os autores destacam ainda como vantagem, que a incubação com FITC-PSA, em sêmen fixado pode ser realizado em qualquer momento, sem interferir na marcação do acrossomo. Sukard et al. (1997) menciona que o uso do FITC/PSA permite uma fácil visualização do acrossomo em relação a outros métodos, e que lectina PSA foi útil para demonstrar os diferentes estágios da reação acrossomal através da distribuição e intensidade da marcação. A sonda PSA limita-se em marcar as regiões acrossomais e o segmento equatorial intensamente, e fracamente as outras regiões da célula espermática (CROSS e WATSON, 1994).

Com o desenvolvimento de análises computadorizadas, a subjetividade dos métodos convencionais de avaliação de sêmen deve ser reduzida, assim como os fatores que podem interferir nos resultados e o tempo para sua execução (YÁNIZ et al., 2014). Os estudos para padronização de novas técnicas de associação das sondas fluorescentes são constantemente desenvolvidos, visando à aplicação na citometria para avaliar os espermatozoides das diferentes espécies (GILLIAN et al., 2005). Múltiplos parâmetros da célula espermática incluindo a integridade de membranas podem ser avaliados através da citometria de fluxo (FREITAS- DELL'AQUA et al., 2009), que tem sido considerada uma boa técnica para análise do sêmen, uma vez que permite a avaliação de múltiplas células (BALLESTER et al., 2007). Yániz et al. (2014) destacou que o uso associado de PI/PSA com o sistema computadorizado, garantiu não só a avaliação morfométrica da célula espermática, mas também o *status* acrossomal, determinando sua presença, tamanho, integridade, intensidade de marcação e suas margens.

O uso de sondas fluorescentes é uma importante ferramenta para avaliação dos danos espermáticos, porém a sua utilização é dificultada por se tratar de uma técnica laboriosa, de alto custo e desuniforme (FARAH et al., 2013). As sondas utilizadas não são produzidas no Brasil, o que implica na necessidade de importação, demonstrando a necessidade de realizar estudos buscando produzir estes compostos em território nacional (ARRUDA et al., 2011).

Viabilizar o uso de outra sonda e padronizar a técnica tende a contribuir para aumentar a aplicabilidade desta análise, melhorando assim os dados relativos às amostras de sêmen. A mensuração da qualidade das amostras tende a garantir que no futuro as análises laboratoriais possam prever a capacidade de fertilização do sêmen de forma mais segura e condizente com a realidade observada a campo (FREITAS- DELL' AQUA et al., 2009).

A *Pisum arvense* Lectina (PLA) foi purificada a partir de uma leguminosa do gênero Viciae. Sua estrutura é bastante semelhante a outras lectinas que apresentam diversas aplicações incluindo a avaliação da condição acrossomal em amostras de sêmen através da interação com glicoproteínas presente na matriz acrossomal. No seu estudo de caracterização ela demonstrou interação favorável com glicose e manose (PINTO-JUNIOR et al., 2017), credenciando-a assim para o emprego na avaliação acrossomal de espermatozoides.

3 CAPÍTULO 1. VALIDAÇÃO DO *PISUM ARVENSE* NA AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE ACROSSOMAL EM RUMINANTES

3.1 RESUMO

Para determinar a qualidade do sêmen, normalmente são realizadas avaliações macroscópicas e microscópicas, que buscam determinar a existência de características fundamentais para a fecundação. Nos exames rotineiros são observados parâmetros como motilidade, concentração, vigor e movimento de massa. Buscando antever com maior exatidão a qualidade e o desempenho das amostras, outras análises foram incorporadas, sendo que a avaliação do acrossomo tem ganhado importância. Uma forma de avaliação é com o uso de sondas fluorescentes, com destaque para a FITC/PSA (Sigma L0770), comercializado por uma empresa multinacional. Recentemente foi demonstrado a possibilidade da utilização da lectina do *Pisum arvense* com a mesma finalidade. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi validar o emprego do *Pisum arvense* (FITC/PLA) na avaliação da reação acrossomal em espermatozoides de ovinos e bovinos. Utilizou-se sêmen ovino, fresco, resfriado e congelado e sêmen bovino congelado. Todas as amostras foram avaliadas com *Pisum arvense* associado ao FITC (tratamento 1- FITC/PLA) e simultaneamente com PSA associada ao FITC (controle - FITC/PSA, Sigma L0770). Os dados obtidos foram submetidos a teste de normalidade de resíduos, análise de variância (ANOVA) e ao teste Tukey para a comparação das médias das três diferentes amostras (fresco, resfriado e congelado) no sêmen ovino ($P < 0,05$). A taxa de acrossomos íntegros foi superior no sêmen fresco em relação ao resfriado e congelado ($p < 0,05$). Foi observado uma correlação positiva entre motilidade espermática e percentual de acrossomos íntegros ($r^2 = 0.7145$), por regressão linear simples no sêmen ovino. Não houve diferença entre os tratamentos, independente da amostra empregada, indicando que tanto a PSA quanto a PLA têm a mesma eficiência para avaliar a reação acrossomal de sêmen de touros e carneiros.

Palavras Chave: Sêmen, Espermatozoide, Acrossomo, Sondas fluorescentes

3.2 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) com sêmen congelado é amplamente empregada na moderna pecuária em todo o mundo, promovendo alta taxa de seleção genética e aumento da produtividade (AIRES et al., 2003). A criopreservação é um processo importante para aplicação da IA e de outras técnicas reprodutivas, para a preservação de espécies, bem como

para o estudo da célula espermática e sua interação com o gameta feminino (AIRES et al., 2003). O processamento de sêmen envolve vários processos como diluição, mudança de temperatura e alterações osmóticas dos espermatozoides, etapas que podem causar danos no DNA, nas membranas e nas organelas (SILVA e GADELLA, 2006). Durante o processo de criopreservação pode ocorrer a ruptura ou desestabilização das membranas, que são altamente vulneráveis ao congelamento e descongelamento, promovendo assim queda significativa na viabilidade espermática (FREITAS- DELL AQUA et al., 2009). Os danos às membranas plasmáticas e acrossomais são tidos como causadores da perda de função celular, tanto pelo vazamento de componentes celulares, como por inativação de proteínas fundamentais (VALCÁRCEL et al., 1997). A deterioração do espermatozoide pode ser medida através da avaliação das suas membranas e organelas, sendo que o aumento no número destas estruturas comprometidas levará a redução das taxas de fertilidade (SILVA e GADELLA, 2006).

Inúmeras técnicas são empregadas na avaliação de sêmen, sendo que a combinação de diferentes métodos agrega maior precisão na estimativa do potencial fecundante das amostras. Mesmo assim, os parâmetros espermáticos e os índices de fertilidade *in vivo* ainda são variáveis (FREITAS- DELL AQUA et al., 2009). Técnicas que indiquem alterações morfológicas ou funcionais podem auxiliar na identificação e seleção de células com potencial fecundante e devem ser incorporadas a rotina de avaliação espermática (GARCIA, 2005). O maior entendimento dos atributos relativos a qualidade espermática é fundamental e possibilita projetar de forma mais segura a estimativa *in vitro* da fertilidade de uma amostra com o resultado obtido a campo (FREITAS- DELL AQUA et al., 2009).

Com o desenvolvimento de novas técnicas de controle hormonal, a IA assumiu uma importância ainda maior na pecuária (REICHENBACH et al., 2008). Desta forma, para a obtenção de bons resultados na fecundação, é necessário avaliar a qualidade dos espermatozoides antes do seu uso nas diferentes técnicas de reprodução assistida (SILVA e GADELLA, 2006).

Neste contexto, a reação acrossomal é um evento essencial para a fecundação, portanto avaliações sobre o *status* acrossomal são importantes para o controle da qualidade do sêmen, nos programas de inseminação artificial e estudos de fecundação (ALMADALY et al., 2012). O uso de sondas fluorescentes é uma ferramenta já consolidada para avaliação dos danos espermáticos, porém a sua utilização é ainda limitada pelo alto custo e por ser uma técnica

laboriosa e que muitas vezes apresenta resultados desuniformes (FARAH et al., 2013). A descoberta de uma variedade de sondas fluorescentes tem possibilitado avaliações mais específicas dos componentes celulares e sua funcionalidade, principalmente quando associada a citometria de fluxo, que permite a análise de um grande número de células em poucos segundos (FREITAS- DELL AQUA et al., 2009). Viabilizar o uso de sondas alternativas, e padronizar a técnica pode contribuir para aumentar a aplicabilidade desta análise na avaliação rotineira de amostras de sêmen. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar e validar a capacidade de caracterização da condição acrossomal da lectina do *Pisum arvense* em espermatozoides de ovinos e bovinos.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reprodução Animal Professor Assis Roberto de Bem/ CAV – UDESC e na Fazenda Pinheiro Seco, em Bom Retiro – SC. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UDESC/CAV, sob o protocolo N° 5118090518.

3.3.1 Reagentes /Corantes

O FITC/PSA (Sigma L0770) foi adquirido diretamente do fornecedor, enquanto que o material em estudo *Pisum arvense* associado ao FITC (FITC-PLA), foi fornecido pelo Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.3.2 Amostras de sêmen

Para o estudo foram utilizadas duas espécies animais, bovinos e ovinos. O sêmen de bovino congelado, foi adquirido de empresa comercial terceirizada. Para obtenção do sêmen ovino, foram utilizados 5 carneiros hípidos, com idade entre 6 e 8 anos, das raças Milchscaf e Lacaune, pertencentes a Fazenda Pinheiro Seco, localizada na Serra Catarinense. Os carneiros foram mantidos em piquetes/baias coletivas durante o experimento e foram alimentados e manejados de acordo com a rotina da propriedade. A coleta do sêmen foi realizada através de vagina artificial aquecida a 37° C, utilizando como manequim uma fêmea em cio.

3.3.3 Avaliação e processamento do sêmen

O sêmen ovino foi avaliado quanto ao aspecto, volume, motilidade, concentração, vigor, turbilhão, concentração, morfologia, além da submissão ao teste de termo resistência (TTR). Após a avaliação inicial, as amostras de sêmen ovino foram processadas e divididas em três sub amostras a saber: sêmen fresco; sêmen resfriado e sêmen congelado. Todas as sub amostras foram utilizadas para avaliação do acrossomo.

O sêmen fresco depois de avaliado foi diluído em Tris gema até apresentar a concentração final de 400×10^6 /mL. Sêmen ovino refrigerado foi diluído da mesma maneira que o sêmen fresco e mantido por 8 horas em uma temperatura constante de 5°C. Já para a obtenção do sêmen ovino congelado, uma porção do sêmen fresco diluído foi adicionado com uma fração de Tris gema contendo glicerol, de modo a proporcionar uma concentração final de 5% do crioprotetor. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, com 100×10^6 células por palheta. Para o congelamento utilizou-se uma curva de resfriamento de 0,25°C/ minuto até atingir 5°C, sendo estabilizadas por duas horas nesta temperatura. Após esse período, as palhetas foram mantidas no vapor de nitrogênio na posição horizontal por 20 minutos e então armazenadas em nitrogênio líquido (-196° C). O descongelamento das amostras foi realizado com banho maria a 37 °C, por 30 segundos.

3.3.4 Confeção e avaliação das lâminas

Após a obtenção das amostras, foram confeccionadas as lâminas para emprego das sondas fluorescentes. As três diferentes sub amostras de sêmen ovino (fresco, resfriado e congelado), bem como o sêmen congelado bovino, passaram pelo mesmo processo. Cada amostra de sêmen de 10 µL foi depositada em um tubo de 1,5 mL contendo 80 µL de meio TALP Sperm (37°C). As amostras foram então homogeneizadas, permanecendo por 3 minutos a 24°C. Após esta preparação a solução foi centrifugada durante 10 minutos a 6.000 X g (Mini centrifuga Cat. No. C1301R), sendo retirado o sobrenadante (aproximadamente 70 µL) e o *pellet* re-suspendido com 80 µL de PBS com 1% de SFB. Procedeu-se então a confecção do esfregaço em lâmina, que após a secagem, passou pelo processo de fixação e permeabilização em etanol, por 30 segundos. Após a permeabilização, as lâminas já secas foram coradas em local escuro, com a adição de 20 µL de solução contendo as respectivas sondas, numa concentração final de 2 mg/mL em

PBS, de acordo com os tratamentos. Tratamento 1: 20 µL de FITC/PLA, tratamento 2 (controle): 20 µL FITC/PSA. Após 10 minutos o esfregaço foi lavado, em local escuro, com água deionizada de forma indireta e sutil para retirar o excesso do corante. Após secar, as lâminas foram avaliadas em microscópio de epi-fluorescência (Zeiss modelo Axio Imager 2, Carl Zeiss, Alemanha) com excitação de filtro de 470/40 e emissão de 525/50.

3.3.5 Análise estatística

As amostras de sêmen ovino foram alocadas em Delineamento Inteiramente Casualizado com fatorial 2X3, sendo dois tratamentos em três tipos de amostras. O delineamento utilizado para bovinos foi Delineamento Inteiramente Casualizado com 10 amostras em 2 repetições. A análise estatística foi realizada utilizando o pacote estatístico SAS versão 9.2 (SAS Institute, Cary, NC), com o procedimento MIXED. Os dados foram testados para distribuição normal dos resíduos por Shapiro-Wilk, homogeneidade de variância e analisados por ANOVA. O teste de comparação de médias foi realizado para os três diferentes tipos de amostras (fresco, resfriado e congelado) no sêmen ovino, pelo teste de Tukey. Para o sêmen ovino foi realizado regressão linear simples para os parâmetros: motilidade e percentual de acrossomo íntegro. Em todas as avaliações foi utilizado o nível de significância de 5%.

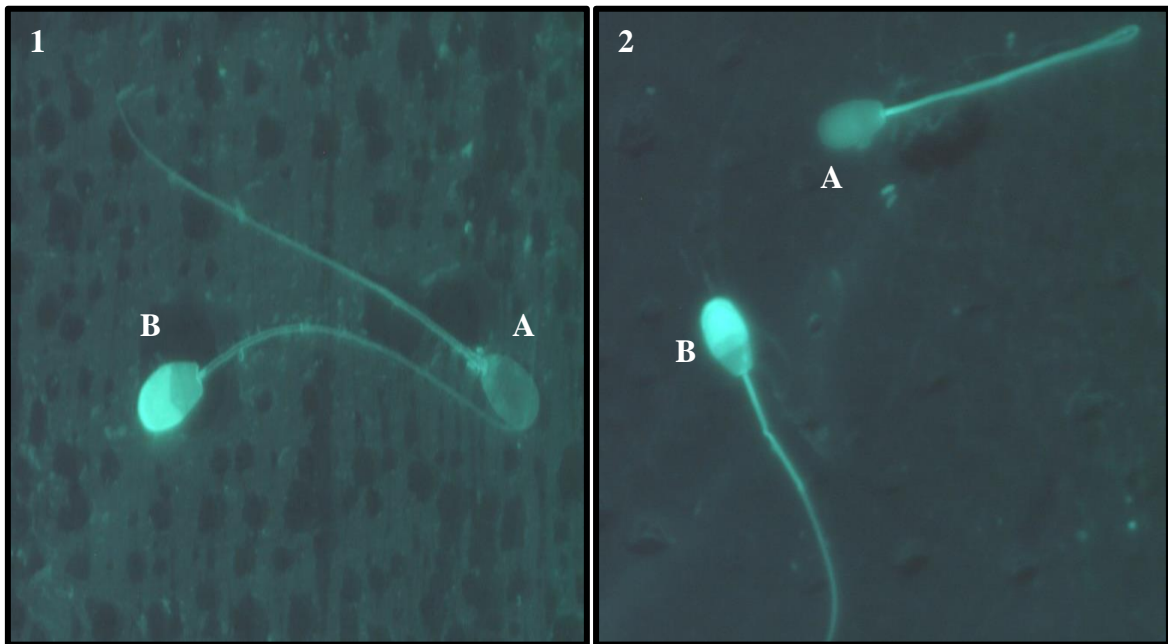
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O PSA apresenta uma lectina que se liga aos glicoconjugados da matriz acrossomal do espermatozoide permeabilizado, rotulando o acrossomo intacto em verde (FALCHI et al., 2018). A lectina presente no corante PSA liga-se ao conteúdo acrossomal, sendo que à medida que a reação acrossomal ocorre, mais conteúdo é perdido para o meio. Desta forma, a progressão da reação acrossomal é indicada pela intensidade e distribuição da fluorescência na região do acrossomo (SUKARDI et al., 1997). Os dados obtidos permitem inferir que o PLA apresenta o mesmo mecanismo de ligação com o conteúdo acrossomal do espermatozoide que o PSA.

O padrão de marcação das células espermáticas foi semelhante com a utilização da sonda FITC/PSA ou da sonda FITC/PLA, como demonstra a figura 2. Resultados semelhantes também foram observados por Valcárcel et al. (1997) com o uso de três diferentes lectinas

(PSA, PNA e WGA), onde PSA e PNA apresentaram padrão de marcação semelhante em amostras de sêmen ovino. A fluorescência emitida das células espermáticas no presente estudo, para ambas as sondas, foi semelhante, sendo também descrito por outros autores (ALMADALY et al., 2012; NUR et al., 2010; AIRES et al., 2003) utilizando PNA e PSA.

Figura 2 - Espermatozoide permeabilizado marcado com o uso de FITC/PSA (1) e com o FITC/PLA (2).



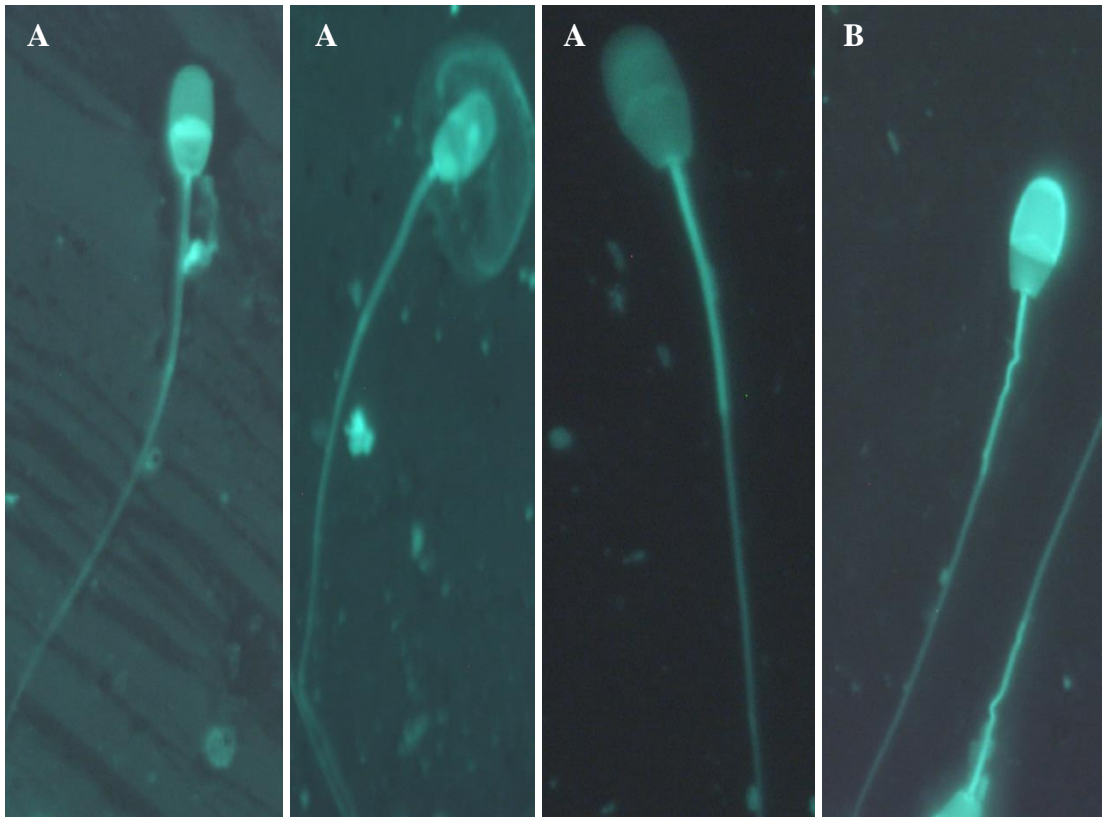
A- Ausência de fluorescência, indicando reação acrossomal.

B- Presença de fluorescência, indicando acrossomo intacto.

Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Vários padrões e intensidades de marcação foram observados por Sukard et al. (1997) em espermatozoides ovinos permeabilizados. Os autores classificaram as células de acordo com o padrão de fluorescência apresentado. Quando não apresentavam fluorescência, ou apresentavam apenas na região equatorial eram consideradas como tendo acrossomo totalmente reagido. Já as que apresentavam algum tipo de fluorescência no acrossomo, eram classificadas como acrossomo intactos. O padrão de caracterização neste estudo está demonstrado na figura 3, sendo que padrões indicando a perda da fluorescência e consequentemente do conteúdo acrossomal, eram considerados reagidos.

Figura 3- Caracterização do acrossomo de células espermáticas permeabilizadas pelo padrão de fluorescência apresentado.



A- Célula espermática: acrossomo que não apresentam fluorescência- Reagido
 B- Célula espermática: acrossomo que apresenta fluorescência- Intacto

Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Durante as avaliações procedidas, foram observadas algumas células apresentando a fluorescência somente na região equatorial. Segundo Tesarik et al., (1993), quando apenas a porção equatorial é corada indica que a célula completou a reação acrossomal recentemente. Isto ocorre já que o segmento equatorial difere da região anterior do acrossomo e seu conteúdo não é liberado na fase inicial da reação acrossomal (GARNER e HAFEZ, 2004).

Como forma de melhor demonstrar a eficácia do FITC/PLA, as amostras de sêmen ovino foram avaliadas em três diferentes formas de conservação (fresco, resfriado e congelado), que sabidamente proporcionam uma progressão nas taxas de acrossomos reagidos. As amostras frescas apresentaram valores de 92,7% e 94,4% de acrossomos intactos para FITC/PSA e FITC/PLA, respectivamente (tabela 1). Estes dados são semelhantes aos encontrados por Nur et al., (2010), que observaram valores de 5,6 % de acrossomos com defeito, após a diluição inicial nas amostras frescas.

Tabela 1- Percentual de acrossomo marcado íntegro com o uso de FITC/PSA (controle) e FITC/PLA (tratamento), nas três formas de conservação de sêmen ovino (fresco, resfriado e congelado).

Forma de Conservação	% Acrossomos marcados		Média
	FITC/PSA	FITC/PLA	
Fresco	92.7	94.4	93.5^a
Resfriado	90.1	87.5	88.8^b
Congelado	76.8	77.8	77.3^c
Média	86.5^A	86.6^A	

Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$).

As amostras de sêmen deste estudo, foram mantidas resfriadas a 5 °C e avaliadas após 8 horas. O resfriamento de sêmen ovino representa uma alternativa válida para o uso em inseminação artificial por via cervical (FALCHI et al., 2018), sendo uma prática facilmente executável. As baixas temperaturas aumentam a vida útil dos espermatozoides por reduzir o metabolismo celular, porém o armazenamento prolongado induz modificações severas nas estruturas morfológicas e funcionais, reduzindo a fertilidade (FALCHI et al., 2018).

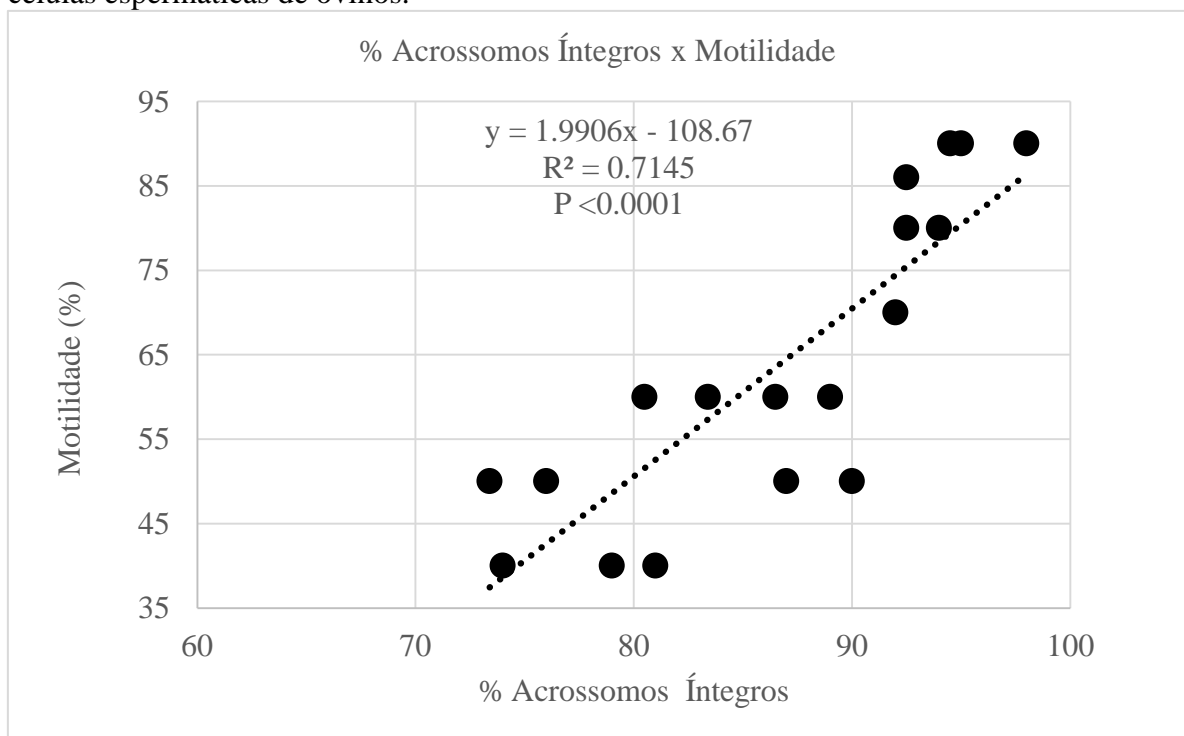
Além da utilização prática, o sêmen resfriado foi utilizado no estudo em função do processo promover a desestabilização das membranas e conseqüentemente perda do conteúdo acrossomal, aumentando o percentual de células reagidas, possibilitando a comparação dos dois corantes num cenário diferenciado de avaliação. Confirmando isso, os dados obtidos demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) no percentual de células intactas das amostras frescas e resfriadas, conforme demonstrado na tabela 1.

Da mesma forma, o sêmen congelado foi empregado nas avaliações das sondas fluorescentes, por sabidamente produzir danos nas estruturas do acrossoma, possibilitando então uma nova comparação dos dois corantes num cenário diferenciado de avaliação. Diferentes autores demonstraram o efeito deletério do congelamento sobre o acrossoma. Segundo Valcárcel et al. (1997), o congelamento e o descongelamento levam a uma diminuição tanto da integridade da membrana plasmática quanto da integridade acrossomal. Porém, o autor destaca que as células viáveis, caracterizadas por membranas plasmáticas intactas, apresentavam na grande maioria acrossomos íntegros, sugerindo que os efeitos

negativos da criopreservação são mais significativos sobre a membrana plasmática. Alcay et al. (2015) relataram que o processo de congelamento e descongelamento promove um aumento no número de células com acrossomo danificado, quando comparada a amostras frescas, sendo que também a motilidade foi afetada negativamente pelo processo. Para Nur et al. (2010), após o descongelamento, as taxas de acrossomos danificados foram maiores quando comparadas ao sêmen fresco e resfriado.

Corroborando com os dados de literatura, neste estudo o congelamento afetou negativamente a integridade de acrossomo e teve também um marcado efeito negativo sobre a motilidade do sêmen ovino. Foi observada uma correlação positiva entre a motilidade espermática e o percentual de acrossomos íntegros, nas amostras de sêmen ovino ($r^2=0.7145$) conforme demonstrado no gráfico 1. Nur et al. (2010) realizaram a correlação entre diversos parâmetros e apresentou uma correlação negativa entre a motilidade e o percentual de células com defeito de acrossomo.

Gráfico 1 - Regressão linear simples da motilidade e percentual de acrossomos íntegros em células espermáticas de ovinos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

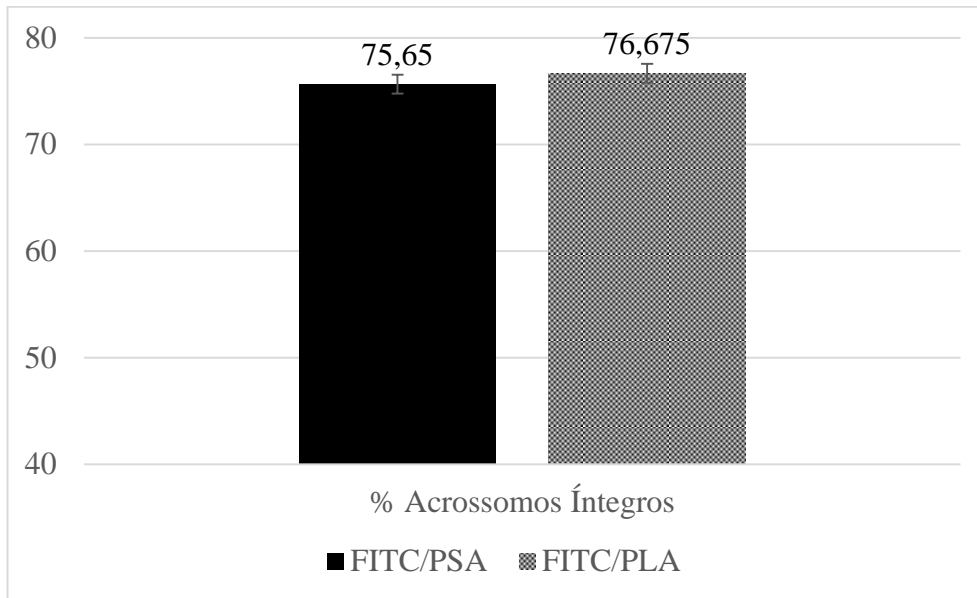
As amostras de sêmen ovino apresentaram valores médios de acrossomo íntegro de 77,3%, após o descongelamento (Tabela 1), resultados que são numericamente superiores aos

existentes na literatura. Alcay et al. (2015), utilizando sêmen de carneiro obtido com o uso de eletroejaculador e protocolo de coloração bastante semelhante, encontraram 62,20% de células com acrossomo intacto, na avaliação após descongelamento. Nur et al. (2010), após o descongelamento, encontraram valores bastante alto de acrossomos danificados, com uma média aproximada 55,1% entre os tratamentos. Possivelmente estas diferenças observadas nos diferentes estudos devem-se a qualidade do sêmen e as diferentes metodologias de processamento empregadas.

Todavia, os dados obtidos demonstram claramente que as duas lectinas avaliadas (FITC/PSA e FITC/PLA) tiveram a mesma efetividade na marcação do *status* acrossomal nas amostras de sêmen ovino, sendo que esta efetividade se manteve nas amostras que foram submetidas ao resfriamento ou ao congelamento, o que permite indicar o FITC/PLA para a avaliação do acrossomo de espermatozoides desta espécie. Corroborando com estes achados, Valcárcel et al. (1997) demonstraram que o uso de três diferentes lectinas apresentaram valores semelhantes na avaliação da condição acrossomal de sêmen ovino.

De forma semelhante, os valores obtidos de acrossomos íntegros para FITC/PSA e FITC/PLA, respectivamente 75,6% e 76,6%, nas amostras de sêmen bovino congelado (gráfico 3), foram semelhantes, indicando a mesma efetividade do FITC/PLA, tanto para sêmen ovino como para sêmen bovino. Almadaly et al. (2012), comparando a efetividade de marcação de duas lectinas em amostras de bovinos (PNA e PSA), observaram que não houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo os valores médios de acrossomos íntegros de aproximadamente 70%.

Gráfico 2 - Percentual de acrossomos íntegros marcados com as sondas fluorescentes FITC/PSA (controle) e FITC/PLA (tratamento) em células espermáticas fixadas e permeabilizadas de bovinos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Importante destacar que a metodologia empregada no uso das sondas fluorescentes pode interferir nos resultados da avaliação. Originalmente a coloração (FITC/PSA) foi desenvolvida para ser empregada em associação ao iodeto de propídio, para a citometria de fluxo. Neste caso, a leitura em microscopia de fluorescência de espermatozoides móveis é difícil, demanda tempo e deve ser imediatamente realizada (MAY et al., 1994). Em função disso, nas avaliações diretas, deve-se dar preferência ao emprego de amostras fixadas.

O protocolo de coloração utilizado em nosso estudo contou com a confecção do esfregaço, fixação e permeabilização, facilitando assim a leitura. O uso da coloração de PSA para avaliar a reação acrossomal em células não fixadas é bastante diferente daquela usada em espermatozoides fixados e com membrana permeabilizada (MAY et al., 1994). Na coloração com a lectina, que envolve a fixação em etanol para permeabilizar a célula, é essencial que o excesso de fluorocromo seja completamente removido por lavagem (VALCÁRCEL et al., 1997), evitando assim a formação de um fundo fluorescente que dificulta ou até mesmo impede a caracterização das células.

A marcação do acrossomo é influenciada pelo agente utilizado na permeabilização, das condições e do tempo de aplicação, bem como do tipo e características das sondas (MENDOZA et al., 1992). Almadaly et al. (2012) avaliaram os métodos de fixação e permeabilização sendo que os melhores resultados foram obtidos com o uso de paraformaldeído 4% e Triton X-100 em comparação ao etanol somente. Possivelmente, esse fato ocorreu em função do longo tempo de fixação e permeabilização utilizado. O padrão de marcação com o uso de FITC-PSA depende do tempo de exposição ao agente permeabilizante, sendo que tratamentos mais longos aumentam o número de células uniformemente marcadas, sem uma clara distinção da região acrossomal. As mudanças observadas podem ser devidas ao maior grau de permeabilização da membrana, e/ou remoção dos ligantes competitivos (MENDOZA et al., 1992).

Corroborando com isso, no presente estudo, basicamente dois tipos de marcações foram observados. Apenas um reduzido número de células apresentava marcações intermediárias, indicando o processo de reação acrossomal, ou completamente coradas, portanto a permeabilização em etanol por 30 segundos mostrou-se pouco laboriosa e produziu uma resposta adequada.

Mendoza et al. (1992), utilizaram o protocolo de permeabilização em metanol e FITC/PSA, demonstrando haver uma forte correlação entre os espermatozoides que exibiram padrão de coloração de células inteiras e os corados supravitalmente com Hoechst 33258. Os autores sugerem que este achado é determinado pela quebra da barreira das membranas plasmáticas em células mortas, levando a exposição dos sítios de ligação da lectina após um tratamento curto com metanol, sendo que isso não ocorre com o espermatozoide vivo, no momento do esfregaço. Uma outra explicação pode sugerir que células mortas não tenham ligantes para bloquear competitivamente a ligação da lectina. Independentemente do mecanismo que possibilita a marcação da célula morta como um todo, os autores destacam que essa relação apresenta um grande significado prático, pois possibilita uma diferenciação entre a reação acrossomal verdadeira e as células mortas, levando em consideração apenas o padrão e a intensidade de marcação. Esta consideração deve ser levada em conta, dependendo do interesse final da análise. O uso associado de outra sonda específica para marcação da viabilidade celular pode ser usado descartando assim células mortas. No presente estudo algumas poucas células apresentavam um padrão de marcação de difícil compreensão, como

totalmente marcadas, o que poderia ser o indicativo de morte celular, mas que não foi comprovado já que não foi utilizado um segundo corante indicativo de vitalidade celular.

Almadaly et al., (2012) avaliaram o método de coloração, em recipiente ou diretamente no esfregaço, concluindo que o método de esfregaço apresentava um percentual mais alto de acrossomos intactos, sugerindo que isso pode ser em função da técnica envolver menor manipulação das amostras. A técnica de coloração utilizada neste estudo foi a coloração diretamente sobre o esfregaço das células previamente permeabilizadas, que é uma técnica simples que envolve poucas etapas facilitando o protocolo e diminuindo a manipulação que pode desencadear danos às membranas. Os dados obtidos demonstram que as informações obtidas sobre o *status* acrossomal das amostras, foi adequado.

3.5 CONCLUSÃO

Conclui-se que o uso da sonda fluorescente conjugada FITC/PLA foi efetiva para a avaliação da condição acrossomal em células espermáticas de bovinos e ovinos, demonstrando a mesma eficiência do FITC/PSA, o que permite validar seu emprego na avaliação acrossomal.

A técnica utilizada é de fácil execução e fornece informações consistentes sobre o *status* acrossomal de espermatozoides de ruminantes, podendo ser incorporadas na avaliação de espermatozoides em trabalhos de pesquisas ou centrais de inseminações como uma importante ferramenta para, junto a outros parâmetros seminais, contribuir na avaliação da qualidade e capacidade fecundante do sêmen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU- HAILA, A.; TULSIANI, D. R. P. Mammalian Sperm Acrosome: Formation, Contents, and Function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 379, n. 2 p. 173-182, **Julho 2000**.
- AFFONSO, J. F.; CARVALHO, H. F.; LANÇONI, R.; LEMES, K. M.; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. Addition of Antioxidants Myoinositol, Ferulic Acid, and Melatonin and Their Effects on Sperm Motility, Membrane Integrity, and Reactive Oxygen Species Production in Cooled Equine Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.59, p. 57-63, 2017.
- AIRES, V. A.; HINSCH, K. D.; MUELLER- SCHOLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER- SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 269-279, 2003.
- ALCAY, S.; TOKER, M. B.; GOKCE, E.; USTUNER, B.; ONDER, N. T.; SAGIRKAYA, H.; NUR, Z.; SOYLU, M. K. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. **Cryobiology**, v. 71, p. 329-333, 2015.
- ALMADALY, E.; EL-KON, I.; HELEIL, B.; EL- FATTOUH, S.; MUKOUJIMA, K.; UEDA, T.; HOSHINO, Y.; TAKASU, M. Methodological factors affecting the results of staining frozen–thawed fertile and sub fertile Japanese Black bull spermatozoa for acrosomal status. **Animal Reproduction Science**, v. 136, p. 23-32, 2012.
- ARRUDA, R. L.; ORRO, I. R.; PASSOS, T. S.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 3, p. 168-184, jul/set 2010. Disponível em www.cbra.org.br
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO H. F.; OLIVEIRA L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 145-151, abril/jun. 2011. Disponível em www.cbra.org.br
- BALLESTER, J.; JOHANNISSON, A.; SARAVIA, F.; HAARD, M.; GUSTAFSSON, H.; BAJRAMOVIC, D.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Post-thaw viability of bull AI-doses with low-sperm numbers. **Theriogenology**, v. 68, p. 934-943, 2006.
- BENCHARIF, D.; BRIAND, L. A.; GARAND, A.; ANTON, M.; SCHMITT, E.; DESHERCES, S.; DELHOMME, G.; LANGLOIS, M. L.; BARRIÈRE, P.; DESTRUMELLE, S.; MUNOZ, O. V.; TAINTURIER, D. Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low Density Lipoproteins). **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 305-313, 2010.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** / Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte: CBRA, 3º ed., 2013. 104p.

CROSS N. L.; MEIZEL, S. Methods for Evaluating the Acrosomal Status of Mammalian Sperm. **Biology of Reproduction**, v.41, p. 635-641, 1989

CROSS, N. L.; WATSON, S. K. Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. **Theriogenology**, v. 42, p. 89-98, 1994.

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

FALCHI, L.; GALLERI, G.; ZEDDA, M. T.; PAU, S.; BOGLIOLO, L.; ARIU, F; LEDDA, S. Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. **Livestock Science**, v. 207, p. 1-8, 2018.

FARAH, O. I.; CUILING, L.; JIAOJIAO, W.; HUIPING, Z. Use of Fluorescent Dyes for Readily Recognizing Sperm Damage. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 14, n.3, p. 120-125, 2013.

FENICHEL, P.; DONZEAU, M.; FARAHIFAR, D.; BASTERIS, B.; AYRAUD, N.; HSI, B. L. Dynamics of human sperm acrosome reaction: Relation with *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 55, p. 944-999, 1991.

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

FREITAS- DELL'AQUA, C. P.; CRESPILOHO, A. M.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p. 213-222, oct/ dez 2009

GADELLA, B. M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization **Animal Reproduction Science**, v.107, p. 229-236, 2008.

GADELLA, B. M.; LUNA, C. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. **Theriogenology**, v. 81, p. 74- 84, 2014.

GARCIA, A. R. O uso de sondas fluorescentes na avaliação morfofuncional de espermatozoides bovinos. **Revista Científica Agrária**. Belém, n. 43, jun/jul 2005.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatóides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Eds). **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004, cap. 7, p.97-110.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M .C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445-457, 2005.

GONZÁLEZ, F. H. D. Endocrinologia Reprodutivo do Macho. In: GONZÁLEZ, F. H. D. **Introdução a endocrinologia Reprodutiva Veterinária**. Porto Alegre. UFRGS, 2002. cap IV.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Fertilização e Clivagem. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Eds). **Reprodução Animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004, cap. 8, p.111-126

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Falhas reprodutivas em machos. IN: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Eds). **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

JANKOVIČOVÁ, J.; SIMON, M.; ANTALÍKOVÁ, J. Methods for evaluation of an acrosome reaction of bovine spermatozoa. **Acta fytotechnica et zootechnica**– Mimoriadne číslo, Nitra, v. 118, p.118-119, 2006.

KOPF, G. S.; GERTON, G. L. The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In "Elements of Mammalian Fertilization" (P. M. Wassarman, ed), v. 1, p. 153-203 1991.

LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.327-336, 2000.

MAY, A. L.; HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. **Theriogenology**, v 43, p. 1301-1316, 1994.

MENDOZA, C.; CARRERAS, A.; MOOS, J.; TESARIK, J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 755-763, 1992.

NEVES, J. P.; NUNES, J. F.; MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; SALGUEIRO, C. C. M.; ALMEIDA, J. L. A. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed. São Paulo: Roca Ltda, 2008, cap 5, p.92.

NUR, Z.; ZIK, B.; USTUNER, B.; SAGIRKAYA, H.; OZGUDEN, C. G. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 73, p. 1267-1275, 2010.

OHASHI, O. M. Inseminação Artificial em Bubalinos. In : GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001, cap. 6, p 97-110.

OLIVEIRA, B. M.; ARRUDA, R. P.; THOMÉ, H. E.; FILHO, M. M.; OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, C.; NICHI, M.; LUCIANO ANDRADE SILVA, L. A.; CELEGHINI, E. C. C. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. **Theriogenology**, v. 82, p. 767-772, 2014.

OZAKI, T.; TAKAHASHI, K.; KANASAKI, H.; MIYAZAKI, K. Evaluation of acrosome reaction and viability of human sperm with two fluorescent dyes. **Archives of gynecology and obstetrics**, v.266, p. 114-117, 2002.

PINTO- JUNIOR, V. R.; SANTIAGO, M. Q.; NOBRE, C. B.; OSTERNE, V. J. S.; LEAL, R. B.; CAJAZEIRAS, J. B.; LOSSIO, C. F.; ROCHA, B. A. M.; MARTINS, M. G. Q.; NOBRE, C. A. S.; SILVA, M. T. L.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Crystal structure of *Pisum arvense* seed lectin (PAL) and characterization of its interaction with carbohydrates by molecular docking and dynamics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 630, p. 27-37, 2017

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial em Bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed. São Paulo: Roca Ltda, 2008, cap 4, p.57-82.

SHULZE, M.; AMMON, C.; SCHAEFER, J.; LUTHER, A. M.; JUNG, M.; WABERSKI, D. Impact of different dilution techniques on boar sperm quality and sperm distribution of the extended ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 182, p. 138-145, 2017

SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N.; UNANIAN, M. M. **Capacidade Reprodutiva do Touro de Corte: funções, anormalidades e fatores que a influenciam**. Embrapa – CNPQC. Campo Grande, 1993. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/320804/capacidade-reprodutiva-do-touro-de-corte-funcoes-anormalidades-e-fatores-que-a-influenciam>.

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

SUKARD, S.; CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science**, v. 46, p. 89-96, 1997.

TROWBRIDGE, I. S. Isolation and chemical characterization of a mitogenic lectin from *Pisum sativum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 6004-6012, 1974.

TESARIK, J.; MENDOZA, C.; CARRERAS, A. Fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction. **Fertility and Sterility**, v. 59, p.424-430, 1993.

VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v.45, p. 299-309, 1997.

VILLAVERDE, A. I. S. B.; FIORATTI, E. G.; PENITENTI, M.; IKOMA, M. R. V.; TSUNEMI, M. H.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D. Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 80, p. 730-737, 2013.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J. (Ed.): **The physiology of reproduction**. New York, v. 2, p.189-317, 1994.

YÁNIZ, J. L.; CAPISTRÓS, S.; VICENTE-FIEL, S.; SOLER, C.; MURGA, J. N.; SANTOLARIA, P. Study of nuclear and acrosomal sperm morphometry in ram using a computer-assisted sperm morphometry analysis fluorescence (CASMA-F) method. **Theriogenology**, v. 82, p. 921-924, 2014.

ZOPPINO, F. C. M.; HALÓN, N. D.; BUSTOS, M. A.; PAVAROTTI, M. A.; MAYORGA, L. S. Recording and sorting live human sperm undergoing acrosome reaction. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p. 1309-1315, 2012.