

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

GESTER BREDA AGUIAR

**ASSOCIAÇÃO DA HEPARINA COM L-ARGININA NA CAPACITAÇÃO
ESPERMÁTICA MELHORA A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

**Campos dos Goytacazes
Junho/2015**

GESTER BREDA AGUIAR

**ASSOCIAÇÃO DA HEPARINA COM L-ARGININA NA CAPACITAÇÃO
ESPERMÁTICA MELHORA A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na Área de Concentração de Reprodução e Melhoramento Genético Animal

ORIENTADORA: Prof^a. Maria Clara Caldas Bussiere

**Campos dos Goytacazes
Junho/2015**

GESTER BREDA AGUIAR

**ASSOCIAÇÃO DA HEPARINA COM L-ARGININA NA CAPACITAÇÃO
ESPERMÁTICA MELHORA A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para Título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em 22 de junho de 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva - UENF

Prof. Dr. Ângelo José Burla Dias - UENF

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão - UFF

Prof^a. Dr^a. Maria Clara Caldas Bussiere – UENF (Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, por ter me presenteado com a vida, com as oportunidades que tive até hoje, por se fazer presente em meu coração em todos os momentos e por iluminar meus caminhos para que eu pudesse alcançar meus objetivos com sabedoria;

Aos meus pais, Gilberto e Polônia, e aos meus irmãos, Adonay e Nathan, por toda sua dedicação, amor e carinho que recebi ao longo de toda minha vida, e por me apoiarem em todas as minhas decisões;

A minha querida companheira e futura esposa, Elaine, por todo seu amor, dedicação, compreensão, sabedoria e por dividir todos os momentos comigo, difíceis ou felizes;

À minha orientadora, Professora Maria Clara Caldas Bussiere, por contribuir na construção do meu conhecimento e desenvolvimento profissional;

Ao Professor Ângelo José Burla Dias, por meio do qual se abriram as portas dessa Universidade, pelos seus grandes ensinamentos no dia-a-dia, pelo seu caráter e pela humildade da transmissão do conhecimento;

À todos os mestres e professores que tive, pelo aprendizado e incentivo;

Ao professor, Claudio Luiz Melo de Souza, pela disposição e colaboração na análise estatística dos resultados;

Aos meus colegas do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, pela amizade, confraternização e pela troca de experiências e conhecimentos;

Aos meus grandes amigos e incentivadores, Bruno Pena Carvalho, Valter Luiz Maciel Junior, Roger Cardoso Maia e Diego Fernando Dubeibe Marin, exemplos de profissionais e dedicação à profissão;

Às técnicas e amigas, Carla e Bruna, pela disposição, ajuda e contribuição na solução de problemas;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Faperj, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

***"O futuro tem muitos nomes. Para os fracos,
é o inatingível. Para os temerosos, o
desconhecido. Para os valentes, a
oportunidade."***
Victor Hugo

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da adição da L-arginina (L-arg, precursora da síntese de NO) na qualidade da capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos criopreservados, e seu reflexo na produção *in vitro* de embriões. Foram utilizados espermatozoides criopreservados de quatro touros (*Bos indicus*) da raça Nelore testados para fertilização *in vitro*. No experimento 1, foram avaliadas a percentagem de espermatozoides capacitados e que apresentaram reação acrossômica (RA) pelo teste da clortetraciclina. A percentagem de espermatozoides que apresentaram as membranas plasmática (MP) e acrossomal (MA) íntegras foi avaliada pela associação de 3 sondas fluorescentes (IP; Hoescht; PSA-FICT). O tratamento com L-arg+heparina aumentou o percentual de espermatozoides capacitados (61,1%), diminuiu a RA (19,6%) ($P < 0,05$) e não apresentou diferença na percentagem de espermatozoides com MP e MA íntegras quando comparado com o controle (67,39% - $P > 0,05$). No experimento 2, a qualidade espermática foi avaliada pela taxa de produção de blastocistos *in vitro* utilizando espermatozoides capacitados por 30 min. A capacitação com L-arg+hep aumentou a taxa de blastocistos (31,8%) quando comparado ao controle FIV capacitado com heparina em presença de COCs ($P < 0,05$). Os resultados nos permitem concluir que a adição de L-arg no meio capacitante contendo heparina: 1) aumenta a taxa de espermatozoides capacitados *in vitro* com 30 min de cultivo e, 2) aumenta a produção *in vitro* de blastocistos bovinos.

Palavras-chave: óxido nítrico, fertilização *in vitro*, teste da clortetraciclina

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of the addition of L-arginine (L-arg, precursor of NO synthesis) in the quality of heparin-induced *in vitro* capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa and its effects on *in vitro* embryo production. Cryopreserved sperm of four Nellore bulls (*Bos indicus*) tested for *in vitro* fertilization (FIV) were used. In experiment 1, were evaluated the percentage of capacitated sperm and acrosome reaction (AR) by chlortetracycline test. The integrity of sperm plasma membrane (PM) and acrosome (AM) was assessed by the association of three fluorescent probes (IP; Hoechst, PSA-FITC). Capacitation with L-arg + heparine increased the percentage of capacitated sperm (61.1%), decreased the AR (19.6%) ($P < 0.05$) and show no difference in the percentage of sperm with PM and AM integrity when compared with control (67,39%, $P > 0.05$). In experiment 2, the sperm quality was evaluated by the the *in vitro* production rate of blastocysts using capacitated sperm for 30 min. The capacitation with L-arg + heparine increased the blastocyst rate (31,8%) compared with control FIV, capacitated with heparine in the presence of COC ($P < 0.05$). The results allow us to conclude that the addition of L-arg in the culture medium containing heparin: 1) increases the number of *in vitro* capacitated spermatozoa with 30 min of cultivation, and 2) increase of bovine *in vitro* production of blastocysts.

Keywords: Nitric Oxide, fertilization *in vitro*, chlortetracycline test

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Capacitação espermática.....	13
2.1.1 Capacitação espermática <i>in vivo</i>	13
2.1.2 Capacitação espermática <i>in vitro</i>	15
2.1.3 Avaliação da capacitação espermática	18
2.2. Óxido nítrico.....	19
2.3. Óxido nítrico na capacitação espermática	21
2.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões	22
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Delineamento experimental.....	26
4.1.1 Experimento I: Ação da L-arginina na capacitação e na integridade das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides	26
4.1.2 Experimento II: Avaliação da qualidade da capacitação espermática por meio da produção de blastocistos <i>in vitro</i>	27
4.2 Meios de cultura	27
4.3 Seleção dos espermatozoides	28
4.4 Capacitação espermática	30
4.5 Avaliação da integridade da membrana plasmática (Hoescht e iodeto de propídio - IP), e acrossomal (PSA)	31
4.6 Avaliação da capacitação pelo teste da clortetraciclina fluorescente (CTC)	31

4.7 Avaliação da qualidade da capacitação espermática pela produção <i>in vitro</i> de embriões.....	32
4.7.1 Seleção e maturação dos oócitos <i>in vitro</i>	32
4.7.2 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	33
4.7.3 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	33
4.7.4 Avaliação do desenvolvimento embrionário	34
4.8 Análise estatística.....	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Experimento I: Ação da L-arginina na capacitação e na integridade das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides	35
5.1.1 Avaliação da capacitação pelo teste de clortetraciclina fluorescente (CTC)	35
5.1.2 Avaliação da integridade da membrana plasmática (MP) e acrossomal (MA).....	37
5.2 Experimento 2: Avaliação da qualidade da capacitação espermática por meio da produção de blastocistos <i>in vitro</i>	38
6. DISCUSSÃO	40
7. CONCLUSÕES	44
8. REFERÊNCIAS.....	45
9. ANEXOS	65

1- INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa atualmente posição de destaque na pecuária mundial, sendo detentor do maior rebanho comercial do mundo (IBGE, 2014), maior exportador mundial de carne bovina, com 1.5 milhões de toneladas (SECEX-MDIC, 2014) e o sexto maior produtor de leite no ranking mundial, com 32.304 bilhões litros/ano (PPM/IBGE, 2012).

Para que este cenário melhore ainda mais, é necessário o correto manejo produtivo do rebanho, e a implementação e desenvolvimento de diversas práticas visando o melhoramento genético do rebanho bovino nacional, tais como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), que vem sendo cada vez mais difundida e utilizada comercialmente em vários países (TAMASSIA, 2007, LONERGAN e FAIR, 2008; VIANA *et al.*, 2012). Segundo Stroud (2012), o Brasil se consolidou como liderança absoluta na produção *in vitro* de embriões respondendo por mais de 85% do total mundial.

Para melhoria dos índices da PIVE, muitos trabalhos vêm sendo realizados avaliando-se as condições durante a maturação do oócito, e o cultivo *in vitro* do embrião (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Porém, há ainda necessidade de mais pesquisas voltadas ao gameta masculino, principalmente relacionadas ao processo de capacitação espermática *in vitro* (SILVA, 2010).

Visando a melhoria desse processo de capacitação espermática *in vitro*, várias substâncias têm sido utilizadas junto aos meios de fertilização, como geldanamicina, osteopontina e L-arginina (O'FLAHERTY *et al.*, 2004; HOU *et al.*, 2008; MONACO *et al.*, 2008; ROY e ATREJA, 2008). A L-arginina (L-arg) desempenha importante função na motilidade espermática, além de induzir a capacitação e reação acrossômica em várias espécies de mamíferos, tendo seu efeito já sido descrito em bovinos (O'FLAHERTY *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2009; SILVA, 2010; LEAL, 2012), equinos (CARVALHO *et al.* 2012; FRANCO-SILVA, 2013), suínos (FUNAHASHI, 2002). Tais efeitos têm sido relacionados à síntese de óxido nítrico (NO) (O'FLAHERTY *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2009).

O NO é uma espécie reativa de nitrogênio (ERN), podendo atuar na sinalização inter e intracelular, como antioxidante ou radical livre (DIXIT e PARVIZI, 2001). Ele é

sintetizado durante a conversão da L-arg em L-citrulina por reações oxidativas catalisadas pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), utilizando oxigênio, fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH) (MONCADA e HIGGS, 1993), dinucleotídeo adenina flavina (FAD), mononucleotídeo flavina (FMN) (DONNELLY *et al.*, 1997) e cálcio/calmodulina (CaM) como co-fatores para as isoformas neuronal e endotelial (IGNARRO, 2000).

Após a identificação do NO como sinalizador intra e intercelular, aumentou-se o número de pesquisas avaliando-se o papel deste em diversos processos no organismo, principalmente devido ao fato da síntese de NO ter sido observada em uma grande variedade de tipos celulares, inclusive naqueles relacionados com a fisiologia espermática (MARLETTA, 1993; HERRERO *et al.*, 1994; O'BRYAN *et al.*, 1998; LEAL *et al.*, 2009). Contudo, grande parte dos trabalhos utilizando a L-arg na capacitação espermática em mamíferos não avaliam seu efeito pós-capacitação, como a produção *in vitro* de embriões.

A escolha no presente estudo, do tempo de capacitação espermática por 30 min antes da co-incubação com os ócitos, ao invés das 4 h citadas na literatura (PARRISH *et al.*, 1994; CHAMBERLAND *et al.*, 2001) como necessárias para capacitação de espermatozoides bovinos, ocorreu porque em nossos estudos prévios observamos que com 30 min, o número de espermatozoides capacitados avaliados pelo teste de CTC ($61,15 \pm 2,22\%$) era semelhante ao observado com 4 h de capacitação ($60,7 \pm 2,1\%$) (LEAL, 2012). Essa observação também foi descrita por Fukui *et al.* (1990), que ao avaliarem o efeito de diferentes concentrações de heparina (0, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$) e diferentes períodos de incubação dos espermatozoides na qualidade da capacitação (0, 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 min), observaram que os períodos de incubação de 5, 15, 30 e 45 min apresentaram as maiores taxas de oócitos fertilizados, diferindo dos 240 min tradicionalmente usados ($P < 0,05$). Além disso, visa-se melhorar o processo à nível de laboratório, devendo o mesmo ser realizado o mais rápido possível para não comprometer a rotina de laboratório de PIV.

Desta maneira, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da L-arginina, substância precursora do NO, na capacitação *in vitro* induzida pela heparina de espermatozoides bovinos criopreservados. Serão identificados seu efeito na qualidade espermática e seu reflexo na produção *in vitro* de embriões. Com isso,

espera-se contribuir no estudo do papel do NO na capacitação *in vitro* dos espermatozoides bovinos, e a importância desse evento no desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Capacitação espermática

2.1.1 Capacitação espermática *in vivo*

O processo de capacitação espermática pode ser definido como modificações bioquímicas, biofísicas, moleculares e metabólicas que ocorrem em todos os domínios dos espermatozoides, conferindo-lhes a capacidade de fertilizar um oócito, seja no processo *in vivo* ou *in vitro* (BAILEY, 2010).

Após ocorrer a ejaculação, os espermatozoides de mamíferos ainda não são capazes de fertilizar o oócito, sendo necessário passar por um processo de capacitação, que *in vivo*, ocorre no trato reprodutor da fêmea (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951).

As mudanças funcionais induzidas pela capacitação possibilitam ao espermatozoide que ele (I) esteja habilitado a se ligar à zona pelúcida do oócito (TOPPER *et al.*, 1999); (II) adquira hiperativação flagelar, necessária para a penetração no oócito (HO e SUAREZ, 2001) e (III) tenha a capacidade de realizar a fusão da sua membrana com a membrana plasmática do oócito (EVANS e FLORMAN, 2002).

Durante a maturação dos espermatozoides no epidídimo, grandes quantidades de colesterol são incorporadas à sua membrana plasmática (BAILEY, 2010). Quando os espermatozoides entram em contato com as secreções das glândulas vesiculares, proteínas ligadoras chamadas BSPs (do inglês *Binder of Sperm Proteins*) são adsorvidas à superfície espermática e se ligam aos fosfolipídios da membrana (HUNG e SUAREZ, 2012). Essas proteínas são encontradas no plasma seminal de inúmeras espécies e em bovinos elas são conhecidas como BSP 1, BSP 3 e BSP 5 (RÊGO, 2010) e representam 70% do total de proteínas presentes no plasma seminal (NAUC e MANJUNATH, 2000). Acredita-se que as BSPs estabilizem a membrana plasmática durante o percurso pelo trato reprodutivo

feminino (BAILEY, 2010) e, se liguem à tuba uterina das fêmeas (GWATHMEY *et al.*, 2003). Tal fato resulta na formação de um reservatório de espermatozoides, onde estes sofrerão o processo de capacitação, permitindo-lhes tornarem-se férteis até o momento em que o COC alcança a tuba uterina (HUNG e SUAREZ, 2012).

Durante a capacitação espermática ocorrem vários eventos bioquímicos, estando este processo correlacionado com modificações na concentração intracelular de íons como o cálcio (BONI *et al.*, 2007), aumento do pH citosólico (VRENDENBURGH-WILBERG e PARRISH, 1995; FRASER, 1995), aumento da concentração de AMPc no espermatozoide (PARRISH *et al.*, 1994; PARINAUD e MILHET, 1996), geração de baixa concentração do anion superóxido (de LAMIRANDE *et al.*, 1998; O'FLAHERTY *et al.*, 2004), e alteração da motilidade espermática, conhecida como hiperativação (YANAGIMACHI, 1994). Também tem sido descrita a ocorrência da fosforilação de proteínas espermáticas, principalmente no resíduo tirosina durante esse processo, tendo papel crucial não só na capacitação, como também na reação acrossômica e penetração do espermatozoide (VISCONTI *et al.*, 1995 a e b; EMILIOZZI e FENICHEL, 1997; GALANTINO-HOMER *et al.*, 1997; VISCONTI e KOPF, 1998; CHAMBERLAND *et al.*, 2001; ROY e ATREJA, 2009).

Como resultado de todos estes eventos, a capacitação altera a arquitetura e permeabilidade da membrana plasmática, o que induz a hiperativação e reação acrossomal, após a ligação do espermatozoide com a zona pelúcida do oócito, havendo a liberação das enzimas hidrolíticas que possibilitam ao espermatozoide penetrar na zona pelúcida e se fundir com a membrana plasmática do oócito (WITTE e SHÄFER-SOMI, 2007).

Alterações na composição e distribuição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides ocorrem durante o processo de capacitação, sendo esta a estrutura que mais sofre mudanças, principalmente por estar em contato direto com o meio capacitante. As principais mudanças são: reorganização de proteínas de membrana e redução da relação colesterol/fosfolipídios na superfície permitindo aumento da fluidez da membrana, principalmente pelo aumento da concentração de fosfatidilcolina, um desestabilizador desta estrutura (CROSS, 2000; FLESCHE e GADELLA, 2000; WITTE e SHÄFER-SOMI, 2007).

Os lipídeos da membrana plasmática do espermatozoide sofrem notável remodelação como preparação para fertilização. Tem sido sugerido que a taxa de capacitação depende da perda de colesterol da membrana. No trato reprodutor feminino, o efluxo de colesterol é acelerado pelos aceptores de colesterol (NEILD *et al.*, 2005), sendo a albumina a proteína de maior secreção do trato feminino participando do início da capacitação por facilitar este processo, o que também é atribuído às lipoproteínas de alta densidade (HDL do inglês *high-density lipoprotein*) também secretadas pelo trato reprodutor feminino (THÉRIEN *et al.*, 1997; RÊGO, 2010).

2.1.2 Capacitação espermática *in vitro* de bovinos

O processo de capacitação de espermatozoides também pode ser reproduzido *in vitro* a partir de meios definidos, com variados graus de sucesso para cada espécie. O processo é induzido por agentes capacitantes, tal como a heparina, que irão desencadear alterações específicas da membrana plasmática dos espermatozoides, dentre outras alterações (BAILEY, 2010).

Visto que o plasma seminal contém inúmeras BSPs que dificultam a capacitação, a remoção do fluido seminal é essencial para que tal processo seja iniciado em condições *in vitro* (YANAGIMACHI, 1994), juntamente à incubação dos mesmos em um meio capacitante contendo heparina (CHAMBERLAND *et al.*, 2001).

A remoção do plasma seminal residual contendo os fatores decapitantes e do diluente utilizado quando os espermatozoides são criopreservados, é o primeiro passo para que a capacitação espermática *in vitro* seja iniciada. Para tal remoção, os métodos mais comumente utilizados são o Percoll e o *swim up* (LEE, 2009).

Gradientes de densidade de Percoll são amplamente utilizados para a seleção de células por centrifugação (LEE *et al.*, 2009). O Percoll é constituído por partículas de sílica coloidal revestidas por polivinilpirrolidona (PVP) e, através dele, são selecionadas as células espermáticas de acordo com seu estágio de maturação e integridade (OSHIO, 1988). Esse processo ocorre por meio da combinação da centrifugação com a motilidade espermática, depositando-se as células móveis no

pellet formado (RHEMREV *et al.*, 1989) e, as impurezas (debris celulares, espermatozoides imóveis, imaturos e anormais, bem como crioprotetores e diluentes) permanecem na fração sobrenadante do tubo (LEE *et al.*, 2009).

Já o teste chamado de *swim up*, é baseado na capacidade inata do espermatozoide em transpor barreiras de fluidos com determinada viscosidade, por meio de sua motilidade progressiva e retilínea, semelhante ao que ocorre *in vivo* (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005). Dessa forma, os espermatozoides viáveis que conseguem se deslocar até a superfície da coluna indicam a sua capacidade inata fertilizante (ZHANG *et al.*, 1998).

Segundo Parrish *et al.* (1988) e Chamberland *et al.* (2001), a heparina tem sido considerada a principal substância que promove a capacitação *in vitro* sem induzir a reação acrossômica em espermatozoides bovinos. Entretanto, este processo também pode ser obtido com o uso de concentrações precisas de bicarbonato, cafeína ou adenosina, onde os espermatozoides atingem o mesmo percentual de capacitação alcançado com o uso da heparina, avaliado pelo teste de clortetraciclina (CTC) (BREININGER *et al.*, 2010). Segundo Chamberland *et al.*, (2001) o meio de capacitação contendo heparina, comparado com o controle (sem heparina), promove uma melhor motilidade progressiva dos espermatozoides, além da melhora na capacitação espermática (RODRIGUEZ *et al.*, 2004; O'FLAHERTY *et al.*, 2004). Segundo Paes de Carvalho *et al.* (2003), apenas 30% dos espermatozoides bovinos capacitaram na ausência de heparina após 4 h de incubação, sendo esta, avaliada pelo teste de penetração em oócitos homólogos.

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) em concentrações baixas e controladas estão também envolvidas nos processos de capacitação e reação acrossômica dos espermatozoides por iniciarem e controlarem muitos eventos celulares, tais como o influxo de Ca^{2+} , a elevação do pH intracelular e da concentração de AMPc, aumento da fluidez da membrana, ativação das cascatas de transdução de sinais, e fosforilação de proteínas, levando à aquisição da capacidade fertilizante do espermatozoide (FORD, 2004; de LAMIRANDE e LAMOTHE, 2008; de LAMIRANDE e O'FLAHERTY, 2008). A adição exógena de O_2 ou H_2O_2 promove o processo de capacitação em espermatozoides humanos (TOSIC e WALTON, 1950; FORD, 2004, de LAMIRANDE e GAGNON, 1995), enquanto que sua remoção com superóxido dismutase e catalase previnem a capacitação em

espermatozoides humanos (de LAMIRANDE e GAGNON, 1993) e de bovinos (O'FLAHERTY *et al.*, 1999), confirmando a evidência de que as ROS estão envolvidas neste processo.

RODRIGUEZ *et al.* (2011) demonstraram que a capacitação induzida pela heparina aumenta o consumo de O₂ após 45 min de incubação estando associada com aumento da capacitação espermática avaliada pelo teste CTC. Desse consumo de O₂, 21% são utilizados para produzir O₂⁻, 19% são utilizados para produzir NO e os 60% restantes podem ser consumidos pela respiração mitocondrial para produzir ATP necessário para suportar o requerimento energético da célula.

O tempo necessário para que o espermatozoide esteja capacitado é dependente da temperatura e da ligação na zona pelúcida que circunda o oócito e induz sua reação acrossômica (YANAGIMACHI *et al.*, 1994; de LAMIRANDE *et al.*, 1997) e varia entre as diferentes espécies animais, sendo necessárias 2 h em camundongos (VISCONTI e KOPF, 1998) e 4 h em bovinos (PARRISH *et al.*, 1988; CHAMBERLAND *et al.*, 2001), quando realizada *in vitro*. Em humanos, essa capacitação é mais rápida, ocorre com 1 h de incubação (COHEN-DAYAG *et al.*, 1995; JAISWAL *et al.*, 1998).

Para induzir a capacitação *in vitro* em bovinos, Parrish *et al.* (1988) incubaram espermatozoides em meio com heparina (10 mg/mL) e observaram que estes requerem um período de 4 h de incubação a 39 °C para se tornarem capacitados. Isso se deve ao fato de que, após os espermatozoides terem sido incubados com oócitos em meio tyroides de fecundação (TALP-fec), na presença de heparina, foi observado após 4 h de incubação, uma maior taxa de oócitos penetrados em relação aos espermatozoides incubados por 25 min, 1 h, 2 h e 3 h. Diferente do autor anterior, onde os melhores resultados foram encontrados com 4 horas, Leal (2012) encontrou resultados favoráveis utilizando um período de incubação dos espermatozoides por 30 minutos, evidenciado por uma maior taxa de blastocistos em relação ao controle sem prévia incubação. Fukui *et al.* (1990), ao avaliarem diferentes concentrações de heparina (0, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg/mL) e diferentes períodos de incubação dos espermatozoides (0, 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 240 min), observaram que os períodos de prévia incubação de 5, 15, 30 e 45 min, apresentaram as maiores taxas de oócitos fertilizados, diferindo dos 240 min, tradicionalmente usados (P <0,05).

2.1.3 Avaliação da capacitação espermática

Visto que a capacitação espermática engloba uma série de importantes eventos, alguns testes foram desenvolvidos para monitorar uma ou mais partes do processo. As mudanças na fluidez da membrana podem ser avaliadas utilizando a sonda fluorescente Merocyanine 540, um corante hidrofóbico que se liga ao folheto interno da membrana plasmática no início da capacitação (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005; GRAHAM e MOCÉ, 2005). Outras formas de avaliação incluem: (I) mudança nos níveis de cálcio intracelular utilizando a clortetraciclina (CTC) (FRASER, 2005; SILVA, 2006), Indo-1 AM ou fluo-3AM; (II) mudanças na fosforilação de proteínas; (III) a capacidade dos espermatozoides de realizarem a reação acrossômica quando induzidos por diferentes substâncias, tais como lysophosphatidylcholine (SALAZAR *et al.*, 2000) ou heparina (PARRISH, *et al.*, 2008); e (III) a produção *in vitro* de embriões, já que é necessário que os espermatozoides estejam capacitados para ocorrer a fertilização dos oócitos (PARRISH, *et al.*, 1994; CHAMBERLAND *et al.*, 2001).

O hidrocloreto de clortetraciclina, ou CTC, é uma sonda que se liga à membrana plasmática dos espermatozoides em uma forma dependente de Ca^{2+}/Mg^{2+} no final da capacitação, quando há o deslocamento dos íons no plasmalema da cabeça do espermatozoide (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005; GRAHAM e MOCÉ, 2005), formando assim um complexo altamente fluorescente, de coloração amarela (SILVA, 2006). Fraser (1995) define três padrões de marcação pelo uso do CTC: padrão F (do inglês *Full*), onde é marcada toda a cabeça do espermatozoide, uma vez que os íons estão distribuídos de forma uniforme no espermatozoide íntegro e não capacitado; padrão B (do inglês *Banded*), onde é marcado somente o acrossoma, pelo fato dos íons estarem concentrados nessa região nos espermatozoides capacitados, e padrão AR (do inglês *Acrosome Reaction*), para espermatozoides reagidos, onde não é possível ver nenhuma marcação na região apical ou apenas uma marcação fraca na região posterior da cabeça.

Outro teste utilizado para avaliação da capacitação espermática é o teste de penetração em oócitos homólogos, que é um importante método para avaliar a

qualidade, tanto do espermatozoide quanto do oócito, sendo muito útil quando se utilizam tratamentos em ambos os gametas para avaliar seus efeitos na funcionalidade dessas células. Dessa maneira, Rosenkranz e Holzmann (1997), classificaram a penetração em três tipos: tipo A – a cabeça do espermatozoide e os cromossomos do oócito são visíveis no ooplasma; tipo B – já ocorreu a descondensação dos cromossomos e ambos os pró-núcleos formaram a membrana nuclear, mas ainda são pequenos e distantes; e tipo C – pró-núcleos atingiram seu maior tamanho e estão mais próximos um do outro.

2.2 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO - do inglês *Nitric Oxide*) é uma molécula gasosa simples, habitualmente encontrada no ar atmosférico em pequenas concentrações, considerada um agente químico altamente reativo devido à presença de um radical livre (elétron extra) (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000). Apresenta meia vida muito curta de menos de 10 segundos devido à sua rápida oxidação a nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (NORMA e CAMERON, 1996).

Existem muitas células capazes de sintetizar o NO por meio de hemeoproteínas da família citocromo P-450, chamadas de óxido nítrico sintases (NOS – do inglês *Nitric Oxide Synthase*), enzimas que convertem a L-arginina em L-citrulina e NO, sendo dependentes de oxigênio, nicotinamida-adenina nucleotídeos (NADPH), flavinas (flavina mononucleótido – FMN e flavina dinucleótido – FDN), bipterinas, além do Ca^{2+} / calmodulina (RETTORI e McCANN, 1998; IGNARRO, 2000). As isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (cNOS) representada pela NOS neuronal (nNOS) e a NOS endotelial (eNOS); e a NOS induzível (iNOS) (DUSSE *et al.*, 2003). As isoformas constitutivas produzem pequenas quantidades de NO, e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que, por sua vez, é controlada pelos níveis de cálcio (Ca^{2++}), participando de diversos processos fisiológicos (MONCADA *et al.*, 1991; MARLETTA, 1994). A isoforma induzível é Ca^{2+} / Calmodulina independente, não expressa sob condições normais, sendo induzida por citocinas e/ou endotoxinas em

uma variedade de células. Necessita de algumas horas para ser expressa, mas, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que as isoformas constitutivas e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam esgotados ou ocorra morte celular (DUSTING e MacDONALD, 1995).

A NOS tem sido detectada no sistema reprodutor de machos e de fêmeas. Baixa concentração de NO *in vitro* estimula a motilidade de espermatozoides de camundongos (HERRERO *et al.*, 1994), hamsters (YEOMAN *et al.*, 1998) e humanos (HELLSTROM *et al.*, 1994; MIRAGLIA *et al.*, 2011). Além disso, estimula a capacitação espermática de humanos (ZINI *et al.*, 1995; SENGOKU *et al.*, 1998, MIRAGLIA *et al.*, 2011) e a reação acrossômica (RA) de espermatozoide de camundongo (HERRERO *et al.*, 1997) e bovinos (ZAMIR *et al.*, 1995, RODRIGUEZ *et al.*, 2011). Leal *et al.* (2009) demonstraram que o bloqueio da síntese de NO no meio capacitante, devido à inibição de sua síntese após a adição de L-NAME, promoveu uma diminuição na qualidade espermática e capacitação, diminuindo o número de oócitos homólogos penetrados, fato também observado por Ferreira-Berbari *et al.* (2010) utilizando aminoguanidina (inibidor da iNOS) e ácido retinóico (inibidor da eNOS). De forma semelhante, a alta concentração de NO parece exercer efeito negativo na motilidade, integridade da membrana e metabolismo de espermatozoides humanos *in vitro* (ZINI *et al.*, 1996; FRANCAVILLA *et al.*, 2000).

Balercia *et al.* (2004) demonstraram que homens férteis com quantidades normais de espermatozoides (normozoospermicos) exibem concentração de NO significativamente menor nos fluidos seminais, que os homens inférteis com diminuição na motilidade espermática (astenozoospermicos).

Os efeitos do NO nos sistemas biológicos dependem das reações químicas nas quais este elemento é submetido. Estes podem ser diretos do NO no alvo biológico, ocorrendo principalmente em lugares onde o NO é produzido em baixas concentração e em curtos períodos de tempo, mediando principalmente processos fisiológicos; ou indiretos quando estes são exercidos por espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas a partir da reação do NO com outros radicais livres (O_2 e O_2^- principalmente), geralmente ocorrendo em lugares submetidos à alta concentração de NO por períodos prolongados de tempo, tendo maior relação com a mediação em eventos patofisiológicos (ESPEY *et al.*, 2000; WINK e MITCHELL,

1998). Assim, uma variedade de funções dentro dos processos fisiológicos e patológicos do organismo, é influenciada pelo óxido nítrico.

2.3 Óxido nítrico na capacitação espermática

Paes de Carvalho *et al.* (2003) demonstraram pela primeira vez em bovinos, que o NO induz a capacitação *in vitro* de espermatozoides criopreservados, porém sua ação é menos efetiva do que a da heparina. Além disso, durante a capacitação induzida pela heparina, espermatozoides sintetizam NO (LEAL *et al.*, 2009).

O efeito do NO na capacitação de espermatozoides bovinos tem sido associada à integridade da membrana plasmática, ao vigor e à motilidade durante a capacitação (PAES DE CARVALHO *et al.*, 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2009), sugerindo que o mesmo participa dos eventos bioquímicos que ocorrem durante a capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos.

A L-arg, precursora da síntese de NO, tem sido utilizada nos estudos sobre o papel do NO na capacitação espermática e reação acrossomal. Ao adicionar L-arg no meio de cultivo (nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 mM), O'Flaherty *et al.* (2004) observaram que a concentração de 10mM melhorou os parâmetros de motilidade, capacitação e reação acrossômica em espermatozoides bovinos após 45 min de incubação. Leal *et al.* (2009) também observaram um aumento da motilidade após 4 h de incubação, quando adicionados 10 mM de L-arg ao meio de capacitação. No mesmo estudo, foi observado um aumento da concentração de nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) no meio de capacitação e também uma melhora do percentual de oócitos penetrados após adição de 10 mM de L-arg. Leal *et al.* (2012) observaram que a adição de 1 mM de L-arg no meio de capacitação *in vitro* aumentou a porcentagem de espermatozoides capacitados e diminuiu a porcentagem de espermatozoides com o acrossoma reagido,

Roy e Atreja (2008) demonstraram um aumento da capacitação espermática em bubalinos ao adicionar 5 e 10 mM de L-arg no meio de capacitação. Porém ao adicionar 0,5 mM de L-NAME, inibidor da síntese de NO por competir pelo mesmo sítio de ligação da L-arg, houve uma inibição da capacitação. No entanto, ao

adicionar 10 mM de L-arg à 0,5 mM de L-NAME, não foi observado reversão do efeito inibitório do L-NAME. Os autores concluíram que a L-arg é um potente indutor da capacitação de espermatozoides de bubalinos, estando associado ao aumento da fosforilação do resíduo tirosina de proteínas específicas (JAGAN MOHANARAO e ATREJA, 2012), e esse efeito foi mediado pela produção de NO.

2.4 Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) abrange as etapas de coleta dos ovários, punção folicular, maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos, assim como o cultivo *in vitro* (CIV) dos supostos zigotos e estruturas embrionárias. Tal técnica caracteriza-se como uma alternativa para produção de embriões por meio da utilização de oócitos imaturos coletados de ovários de doadoras de várias idades e estádios fisiológicos e visa acelerar a reprodução de animais geneticamente superiores (VARAGO, *et al.* 2008).

O Brasil atualmente é o maior produtor mundial de embriões produzidos *in vitro* (aproximadamente 265.000 transferências/ano), sendo as raças Nelore e Gir, as de maior participação no mercado nacional (68,5% e 16,5% respectivamente) (STROUD e CALLESEN, 2012; VIANA *et al.*, 2012).

Mesmo apresentando grande crescimento em sua utilização na última década, a PIV apresenta alguns resultados que permanecem abaixo do seu potencial. Apenas 35-40% dos oócitos bovinos maturados, fecundados e cultivados *in vitro* desenvolvem-se até o estágio de blastocisto (MAYES e SIRARD, 2001; SIRARD *et al.*, 2006; LONERGAN e FAIR, 2008; RIZOS *et al.*, 2008), a baixa resistência a congelabilidade dos embriões produzidos pela PIV em relação aos obtidos pela transferência de embriões (TE) (ABE *et al.*, 2002; GÓMEZ *et al.*, 2008), e a baixa taxa de prenhez destes embriões (WARD *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2005; PETERSON e LEE, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2007; PONTES *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2012).

Para melhoria desses índices, muitos trabalhos vêm sendo realizados avaliando-se as condições durante a maturação do oócito, e o cultivo *in vitro* do embrião

(GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Porém, há ainda necessidade de mais pesquisas voltadas ao gameta masculino, principalmente relacionadas ao processo de capacitação espermática *in vitro* (SILVA, 2010).

Segundo Gonçalves *et al.* (2007), as diversas vantagens e aplicações dessa biotécnica estão relacionadas à: 1) determinação e controle do sexo dos produtos; 2) obtenção de uma maior quantidade de embriões com menor custo; 3) rápidas e melhores possibilidades para executar programas de cruzamento; 4) facilidade de importação e exportação de embriões criopreservados; 5) aumento da eficiência dos programas de referência em produção; 6) estimulação do efeito materno sobre a descendência; 7) rápida multiplicação de indivíduos de raças ameaçadas de extinção; 8) potencialização do uso de espermatozoides criopreservados de alto valor genético (maior número de embriões obtidos por palheta) e 9) testar *in vitro* a fertilidade potencial de machos utilizados em programas de melhoramento genético.

Do ponto de vista científico, a PIV de embriões possibilita o estudo fisiológico dos eventos envolvidos na fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, assim como o estudo e desenvolvimento de outras biotécnicas reprodutivas a partir da micromanipulação de gametas e embriões.

No processo de MIV, os oócitos ainda imaturos retomam a meiose assim que são retirados do ambiente folicular (BEVERS e IZADYAR, 2002; LONERGAN *et al.*, 2003), pelo fato de perderem o contato com substâncias inibitórias presentes no líquido folicular (SIRARD *et al.*, 2006). Dessa forma, os oócitos precisam ser colocados rapidamente em meio de maturação adequado. O processo de obtenção de oócitos imaturos pode ser realizado via punção de ovários provenientes de matadouros ou pela aspiração folicular guiada por ultrassom em animais vivos. Geralmente os oócitos são obtidos de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro, isso porque somente os oócitos que já atingiram seu crescimento total podem se tornar competentes à fertilização, o que ocorre quando o folículo tem em torno de 2 mm. Portanto, oócitos provenientes de folículos menores que 2 mm seriam incompetentes para completar a maturação e permitirem o desenvolvimento embrionário normal (LONERGAN *et al.*, 1994; LEQUARRE *et al.*, 2005).

Segundo Sirard (2000), são descritas três distinções dos aspectos de maturação oocitária: 1) a maturação nuclear que descreve modificações dos cromossomos desde o estágio de VG até a metáfase da segunda meiose II (MII). 2)

a maturação citoplasmática que abrange as mudanças na distribuição e organização de organelas individuais desde a VG até o estágio de MII e 3) a maturação molecular que é um legado de instruções acumuladas durante o estágio de VG e que controla a progressão nuclear e citoplasmática.

Na PIV de embriões bovinos, a FIV ocorre logo após a MIV, onde a qualidade dos oócitos, e a procedência dos espermatozoides utilizados têm crucial influência no sucesso do processo (HANSEN, 2006). A maioria dos laboratórios usa espermatozoides criopreservados no processo de fecundação *in vitro* em bovinos. Porém, após o descongelamento, é necessário selecionar os espermatozoides vivos e capazes de fertilizar, processo realizado na maioria das vezes pela separação em gradiente de Percoll (GALLI e LAZZARI, 1996). Todavia, esses espermatozoides selecionados ainda não são capazes de fertilizar o oócito e, portanto, devem sofrer o processo de capacitação espermática. Esse processo é induzido *in vitro* pela adição de heparina ao meio de fertilização culminando com a reação acrossomal que ocorre pela exocitose de enzimas que facilitam a penetração do espermatozoide pela zona pelúcida e modificam as membranas da região pós-acrossomal, sítio da interação entre oócito e espermatozoide (SIDHU e GURAYA, 1989).

Após a fertilização os possíveis zigotos são transferidos para o meio de cultivo, onde permanecem até atingir o estágio de blastocisto, podendo depois serem transferidos para receptoras aptas ou criopreservados. Nesse período tão importante ocorrem: as primeiras clivagens, a ativação do genoma embrionário quando o embrião possui de 8 a 16 células; a compactação da mórula no dia 5 de desenvolvimento, que envolve o estabelecimento do contato célula-célula; e a formação do blastocisto nos dias 6-7, o qual envolve a diferenciação de dois tipos de células, o trofoectoderma e a massa celular interna (ICM – do inglês *inner cell mass*). Qualquer modificação no ambiente de cultivo embrionário pode afetar uma ou todas essas etapas podendo interferir na qualidade embrionária (LONERGAN *et al.*, 2003).

3- OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da L-arginina associada ou não com heparina na capacitação, na integridade da membrana espermática e seu reflexo na produção *in vitro* de embriões bovinos

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da adição da L-arginina em meio capacitante com ou sem heparina, após 30 min de cultivo:
 - na capacitação espermática
 - na integridade das membranas plasmática (MP) e acrossomal (MA)
 - na produção *in vitro* de embriões

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

4.1.1 Experimento I: Ação da L-arginina na capacitação e na integridade das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides

Foram utilizados espermatozoides criopreservados de quatro touros comerciais da raça Nelore (*Bos indicus*), testados para FIV. As amostras de cada touro foram divididas em quatro grupos para as análises das alterações espermáticas, sendo:

- Grupos experimentais:

- Controle 0 h: espermatozoides colocados em meio sem hep e L-arg, na ausência de COCs;
- T-Hep: espermatozoides cultivados em meio com heparina durante 30 mim em ausência de COC;
- T-L-arg: espermatozoides cultivados em meio com 1 mM de L-arg sem heparina durante 30 mim em ausência de COC;
- T-L-arg + Hep: espermatozoides cultivados em meio com 1 mM de L-arg com heparina durante 30 mim em ausência de COC.

4.1.2 Experimento 2: Avaliação da qualidade da capacitação espermática pela produção de blastocisto *in vitro*

- Grupos experimentais:

- Controle FIV: espermatozoides adicionados ao meio de FIV com heparina, sem capacitação prévia (PARRISH, *et al.* 1994).
- T-hep: espermatozoides adicionados ao meio de FIV sem heparina, após capacitação de 30 min com heparina em ausência de COC;
- T-L-arg: espermatozoides adicionados ao meio de FIV sem heparina, após capacitação de 30 min com L-arg e sem heparina em ausência de COC;
- T-L-arg + hep: espermatozoides adicionados ao meio de FIV sem heparina, após capacitação de 30 min com 1mM de L-arg e heparina em ausência de COC.

4.2 Meios de cultura

Todos os reagentes e meios utilizados no processo de capacitação e testes espermáticos foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, USA), exceto quando mencionados.

Os meios utilizados no processo de produção *in vitro* de embriões foram obtidos da empresa Progest Biotecnologia em Reprodução Animal® (Botucatu, Brasil).

O meio-base utilizado na capacitação foi o de Tyrodes modificado (TALP-sp) (PARRISH *et al.*, 1988), suplementado com 6 mg/mL de BSA, livre de ácidos graxos, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. O meio de lavagem empregado na capacitação espermática foi o de Tyrodes modificado, segundo CHAMBERLAND *et al.* (2001).

4.3 Seleção dos espermatozoides

Foram utilizados espermatozoides criopreservados (Alta Genetics, Uberaba, Brasil e ABS Pecplan, Delta, Brasil) de quatro touros (*Bos indicus*) da raça Nelore, testados para FIV.

O fluxograma da preparação espermática pode ser observado na Figura 1. O gradiente de Percoll foi utilizado para separação dos espermatozoides viáveis após terem sido descongelados. Para a preparação do Percoll 90% foram adicionados 540 μ L de Percoll comercial (Amersham Pharmacia Biotech Ltd, Little Chalfont, UK) e 60 μ L de TALP 10x. O Percoll 45% foi preparado com a adição de 200 μ L de Percoll 90% acrescido de 200 μ L de TALP Chamberland com 1% de PVA (CHAMBERLAND *et al.*, 2001) já estabilizado em estufa a 37 °C por 1 h. Para preparação do gradiente de mini-Percoll utilizado para separação dos espermatozoides foi acrescentado em um microtubo de 1,5 mL, 400 μ L de Percoll 90% e, em seguida, foram acrescentados lentamente, 400 μ L de Percoll 45%, evitando que eles se misturassem. Este procedimento foi realizado sempre com no mínimo 1 h de antecedência ao processo de seleção espermática.

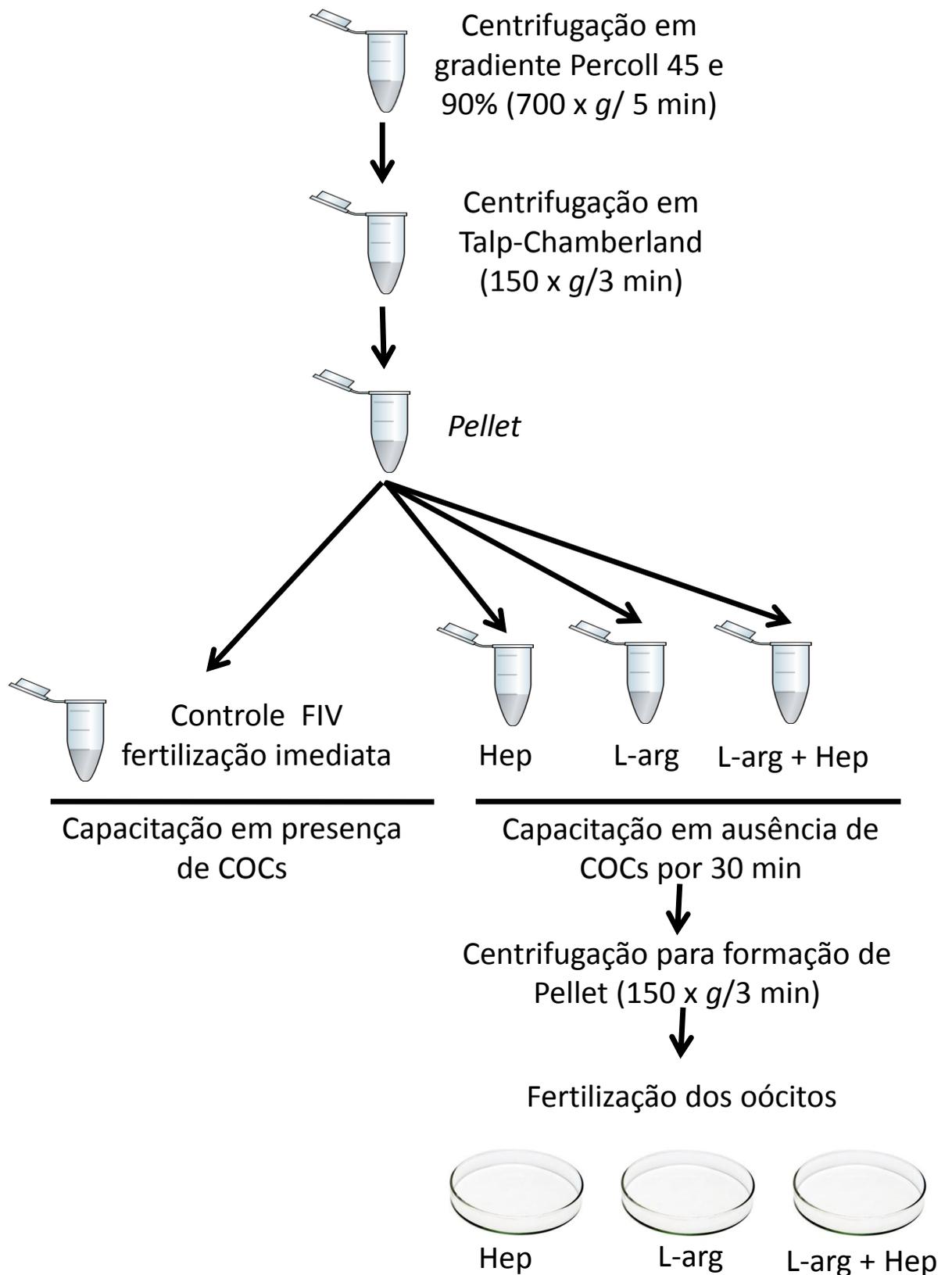


Figura 01 - Esquema demonstrando o fluxograma utilizado no processo de preparação espermática e capacitação dos espermatozoides nos diferentes tratamentos (Controle 0h ou Controle FIV, T-hep, T-L-arg, T-L-arg+hep) e fertilização dos oócitos no processo de produção *in vitro* de embriões.

Os espermatozoides criopreservados foram descongelados a 37°C por 30 segundos e então submetidos à centrifugação a 700 x *g* por 5 min em gradiente de mini Percoll 45 e 90% (PARRISH e EID, 1994). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento formado (*pellet*) foi lavado em 400 µL de TALP Chamberland e submetido à nova centrifugação a 150 x *g* por 3 min. Após a última centrifugação, os espermatozoides foram avaliados (motilidade e vigor) para confirmação da qualidade dos espermatozoides e em seguida foi determinada a concentração espermática. Os espermatozoides selecionados (*pellet*) foram transferidos para os respectivos tubos de capacitação.

4.4 Capacitação espermática

A capacitação espermática *in vitro* foi induzida em 200 µL de meio de capacitação, contendo 20 µg/mL de heparina (PARRISH *et al.*, 1988) (exceto no grupo capacitação somente com L-arginina), acrescido ou não de 1 mM de L-arginina (LEAL, 2012) em estufa a 38,5^o C com atmosfera umidificada com 95% de ar e 5% de CO₂.

Em ambos os experimentos, o tempo de capacitação foi de 30 minutos (LEAL, 2012). No experimento 1, a concentração espermática foi ajustada para 10 x 10⁶ espermatozoides/mL e no experimento 2, a concentração foi ajustada para 2 x 10⁶ espermatozoides/mL.

A capacitação espermática foi induzida com 30 min de cultivo em ausência dos COC quando os espermatozoides foram avaliados quanto a integridade da membrana acrossomal e plasmática, e percentual de espermatozoides capacitados, assim como antes de serem utilizados na FIV (hep, L-arg, L-arg+hep). A capacitação espermática em presença de COCs foi induzida no grupo controle com heparina.

4.5 Avaliação da integridade da membrana plasmática (Hoescht e iodeto de propídio - IP) e acrossomal (PSA)

Após o período de capacitação prévia de 30 min para os tratamentos, e imediatamente após a lavagem no grupo controle 0h, uma alíquota de 50 µL de espermatozoides (25×10^6 espermatozoide/mL) foi exposta ao Hoescht 33342 (40 µg/mL) e IP (0,5 µg/mL), PSA-FITC (100 µg/mL) por 5 min para observação da integridade celular, e acrossomal, respectivamente (CELEGHINI *et al.*, 2007). A seguir, uma amostra de espermatozoides foi colocada entre lâmina e lamínula com glicerol e os espermatozoides foram observados individualmente no microscópio (NIKON - Eclipse TE300, Melville, NY, USA) (400x).

O IP se liga ao DNA de células com danos na membrana plasmática (GRAHAM *et al.*, 1990) corando o núcleo de vermelho, enquanto que o Hoescht se liga ao DNA de todas as células corando o núcleo de azul (CASEY *et al.*, 1993). O PSA-FITC marca o acrossoma lesado do espermatozoide corando-o em tons entre o verde e amarelo (GRAHAM *et al.*, 1990).

Um total de 16 repetições, sendo quatro repetições de quatro touros diferentes, foram analisadas. Para cada avaliação, 200 células foram contadas e classificadas em 4 grupos, adaptado de Celeghini *et al.* (2007): (I) espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas; (II) espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossomal integra; (III) espermatozoides com membrana plasmática integra e acrossomal lesada; e (IV) espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal lesadas.

4.6 Avaliação da capacitação pelo teste da clortetraciclina fluorescente (CTC)

Com o intuito de quantificar o percentual de espermatozoides capacitados, foi utilizada a técnica de marcação com hidrocloreto de clortetraciclina (CTC), modificado por Cormier *et al.* (1997). A solução estoque de CTC (0,75 mM CTC, 20 mM tris-base e 5 mM DL-cysteine) foi preparada no dia de uso. Foram adicionados

15 µL da solução final de CTC [300 mL de solução estoque de CTC misturado com 10 µL de paraformoldeído (4%) em 20 mM de tris-base e 60 µL de diazabiciclo octane – DABCO (Invitrogen Molecular Probe, Eugene, OR, USA)] a 15 µL de espermatozoide (25×10^6 espermatozoides/mL). Em seguida, 10 µL dessa suspensão contendo os espermatozoides corados foram colocados entre lâmina e lamínula e observados no microscópio de epifluorescência – NIKON (Eclipse TE300, Melville, NY, USA; 40x – excitação de 440 nm e emissão de 470 nm).

Um total de 16 repetições, sendo quatro repetições de cada touro (n=4) foram analisadas. Para cada avaliação, 200 células foram contadas e classificadas em 3 grupos, como descrito por Fraser *et al.* (1995): F (fluorescente), espermatozoide intacto e não capacitado, fluorescendo toda superfície; C (capcitado) espermatozoide capacitado intacto, perda de fluorescência na região pós-acrossomal; e RA, espermatozoide com acrossoma reagido, perda de fluorescência na região pós-acrossomal e acrossomal, expressando fluorescência apenas na peça intermediária.

4.7 Avaliação da qualidade da capacitação espermática pela produção de blastocistos *in vitro*

4.7.1 Seleção e maturação dos oócitos *in vitro*

Foram selecionados oócitos com graus 1 e 2, de acordo com a classificação de De Loos *et al.* (1989) a partir de ovários obtidos de matadouros locais. Esses ovários foram transportados para o laboratório em garrafas térmicas contendo solução salina estéril a 0,9% de NaCl e antibiótico (penicilina/estreptomicina). Após a seleção, os oócitos foram lavados 3 a 4 vezes no meio Progest Lavagem® (Progest Biotecnologia em Reprodução Animal, Botucatu, Brasil) e posteriormente transferidos para a placa de maturação.

O meio utilizado para maturação *in vitro* foi o Progest Maturação *in vitro*® (Progest Biotecnologia em Reprodução Animal, SP, Brasil). A maturação foi

realizada em placas de Petri (35x10mm, Corning Inc. Acton, MA, USA) com gotas de 100 μL de meio imergidas em óleo mineral (20 oócitos por gota, 5 μL de meio/oócito) em estufa a 38,5⁰ C sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 22 horas.

4.7.2 Fertilização *in vitro* (FIV)

Os espermatozoides selecionados pelo método de mini-Percoll foram lavados em TALP Chamberland para remoção das substâncias capacitantes do meio. Para isso, os microtubos contendo o meio de capacitação e os espermatozoides foram inicialmente submetidos à centrifugação de 150 x *g* por 3 minutos para a formação de *pellet*. Posteriormente, foi determinada a concentração espermática do *pellet* pela contagem na câmara de Neubauer, por meio da qual foi determinada a dose inseminante utilizada na FIV, fixada em 2 x 10⁶ espermatozoides/mL.

Os espermatozoides foram adicionados às gotas de FIV de 50 μL , sendo utilizada uma placa para cada tratamento, onde permaneceram co-incubados com os oócitos durante 18 h nas mesmas condições da MIV, em meio Progest Fertilização *in vitro*® (Progest Biotecnologia em Reprodução Animal, Botucatu, Brasil).

4.7.3 Cultivo *in vitro*

O meio de cultivo *in vitro* (CIV) utilizado foi o Progest Cultivo *in vitro*® (Progest Biotecnologia em Reprodução Animal, SP, Brasil). Após 20 horas, os prováveis zigotos foram submetidos à pipetagens consecutivas para remoção parcial das células do *cumulus* e espermatozoides. A seguir, foram transferidos para as gotas de CIV (1 zigoto/5 μL de meio), e permaneceram incubados por 7 dias a 38,5 °C, com atmosfera umidificada com 95% de ar e 5% de CO₂.

Após 72 horas de cultivo foi realizada a renovação de 60% do meio de cultivo (*feeding*).

4.7.4 Avaliação do desenvolvimento embrionário

A taxa de clivagem foi avaliada 48 horas após a FIV, onde foram considerados clivados os embriões que apresentaram duas ou mais células, sem sinais de fragmentação ou degeneração celular.

No dia 7 (D7) foi observada a taxa de blastocistos de acordo com os critérios recomendados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS, 1998).

4.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar os efeitos dos tratamentos sobre as características estudadas e as médias comparadas pelo teste de Tukey, no nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS

5.1 Experimento I: Ação da L-arginina na capacitação e na integridade das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides

5.1.1 Avaliação quantitativa da capacitação pelo teste de clortetraciclina fluorescente

A avaliação da percentagem de espermatozoides capacitados com a utilização da técnica de CTC demonstrou que houve diferença entre os grupos experimentais ($P < 0,05$) (Fig 2).

A capacitação com L-arg+hep em ausência de COC apresentou o maior percentual de espermatozoides capacitados ($61,15 \pm 1,18\%$), diferindo dos tratamentos de capacitação em ausência de COC com hep e com L-arg, e do controle 0 h sem capacitação em ausência de COC ($47,01 \pm 4,02\%$; $26,16 \pm 3,83\%$; $18,24 \pm 4,45\%$, respectivamente) ($P < 0,05$, Fig 2B). O percentual de espermatozoides não capacitados foi maior no controle 0 h ($68,43 \pm 5,05\%$) diferindo ($P < 0,05$) dos valores encontrados na capacitação com L-arg ($45,81 \pm 4,31\%$), com hep ($25,8 \pm 3,44\%$) e com L-arg+hep ($19,23 \pm 1,52\%$) (Fig 2A).

O percentual de espermatozoides com acrossoma reagido (RA) foi menor ($P < 0,05$) no controle 0 h ($13,72 \pm 2,56\%$), seguidos pela capacitação com L-arg+hep ($19,6 \pm 1,11\%$), capacitação com hep ($25,2 \pm 3,32$) e capacitação com L-arg ($29,86 \pm 5,20$) em ausência de COC (Fig 2C).

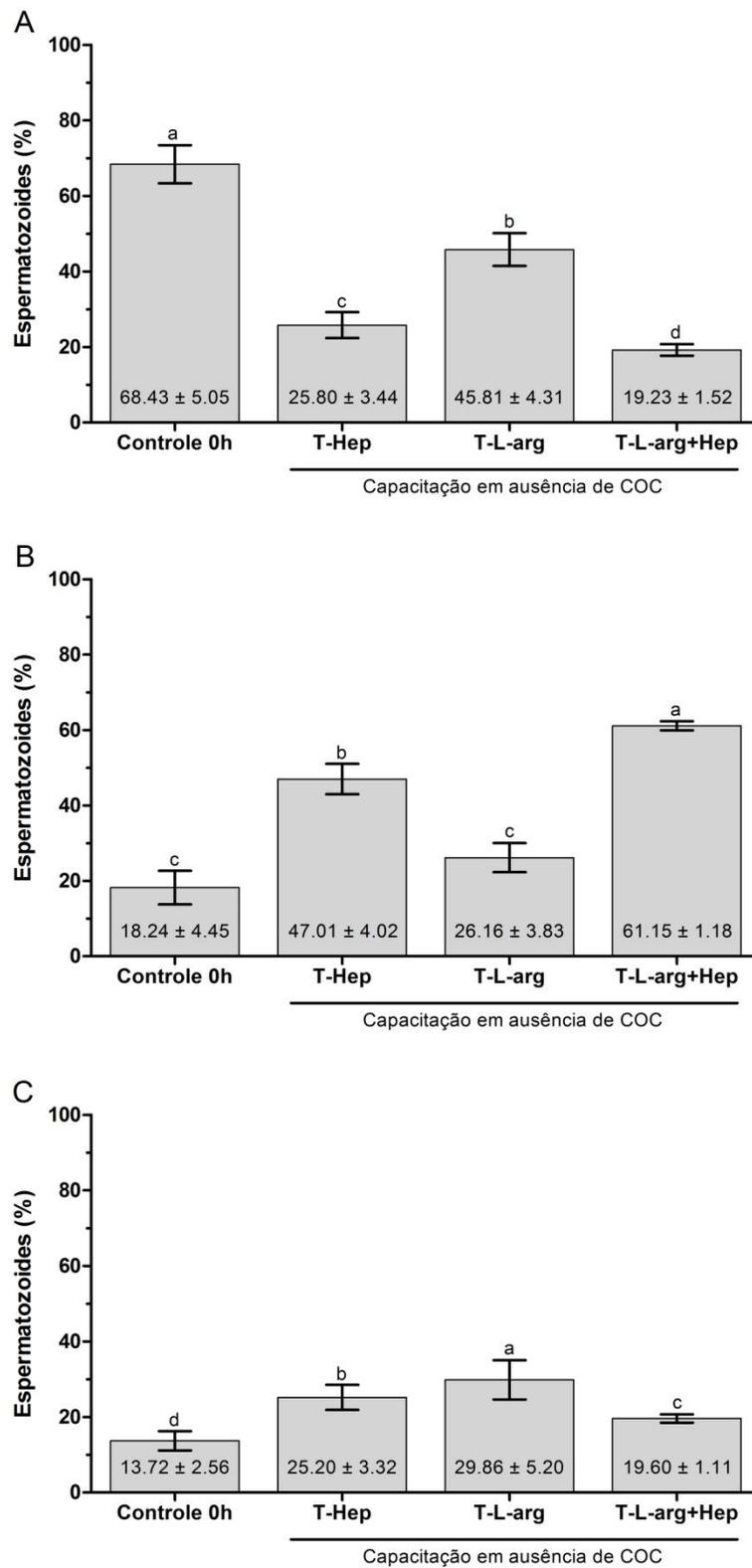


Figura2. Porcentagem de espermatozoides não capacitados (A), capacitados (B) e com acrossoma reagido (C) em função dos tratamentos em ausência de complexos *cumulus*-oócito: controle imediato, capacitação 30 min com heparina, capacitação 30 min com L-arginina e capacitação 30 min com L-arginina+heparina. Dados foram apresentados como médias ± IC (Intervalo de Confiança $P < 0.05$) de 4 repetições de 4 touros. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$). Em cada repetição foram avaliados 200 espermatozoides. Os números em negrito na base de cada barra representam as médias observadas em cada tratamento.

5.1.2 Avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal

A análise de variância mostrou que houve diferença ($P < 0,05$) na porcentagem de espermatozoides quanto à integridade de membrana plasmática e acrossomal para os tratamentos, após capacitação (30 min) (tabela 1).

Tabela 1. Ação da L-arg em presença ou não de heparina na integridade da membrana plasmática (MP) e acrossomal (MA) de espermatozoides criopreservados após a capacitação de 30 min *in vitro* em ausência de COCs, avaliada com probes fluorescentes FITC-PSA, IP e Hoescht 33342.

Métodos de capacitação	Classificação da integridade de membranas			
	MP e MA Íntegras	MP lesada e MA íntegra	MP íntegra e MA lesada	MP e MA lesadas
Controle 0 h	66,77* \pm 6,97 a	22,54 \pm 4,89 a	5,08 \pm 2,10 c	5,28 \pm 4,67 b
T-Hep	67,49 \pm 5,07 a	10,9 \pm 2,83 c	5,03 \pm 1,47 c	16,6 \pm 6,17 a
T-L-arg	67,19 \pm 6,50 a	10,50 \pm 4,65 c	12,7 \pm 3,81 a	9,6 \pm 5,88 b
T-L-arg + hep	67,39 \pm 6,38 a	15,4 \pm 2,47 b	9,13 \pm 4,89 b	8,05 \pm 3,73 b

*Médias percentuais (\pm IC - Intervalo de Confiança $P < 0,05$) seguidas de mesmas letras na coluna, não diferem entre si, segundo o teste de Tukey ($P \leq 0,05$, $n=16$, $N= 64$).

L-arg: L-arginina; hep: heparina

Dentro da classificação membranas plasmática e acrossomal integras não houve diferença entre os grupos controle 0 h sem capacitação prévia e os capacitados em presença de hep, L-arg, e L-arg+hep (66,77 \pm 6,97%; 67,71 \pm 5,07%; 67,19 \pm 6,50% e 67,39 \pm 6,38%, respectivamente) ($P < 0,05$).

O controle 0 h apresentou a maior taxa de MP lesada e MA intacta (22,54 \pm 4,89%), demonstrando diferença para a capacitação com L-arg+heparina em ausência de COC (15,44 \pm 2,47%) ($P < 0,05$). Os tratamentos de capacitação com L-arg e de capacitação com hep em ausência de COC (10,50 \pm 4,65% e 10,98 \pm 2,83%, respectivamente) não apresentaram diferença entre si ($P > 0,05$), mas diferiram dos grupos controle e capacitação com L-arg+heparina ($P < 0,05$).

A capacitação com L-arg apresentou a maior porcentagem de espermatozoides com MP íntegra e MA lesada (12,7 \pm 3,81%), diferindo dos demais tratamentos ($P < 0,05$). Contudo, os grupos controle 0 h (5,08 \pm 2,1%) e capacitação com hep (5,03 \pm 1,47%) não diferiram entre si ($P > 0,05$).

Maior percentual de espermatozoides com MP e MA lesadas foram observados quando estes foram capacitados na presença de heparina (16,6 \pm

6,17%), diferindo do controle 0 h, da capacitação com L-arg e da capacitação com L-arg+hep ($5,28 \pm 4,67\%$; $9,61 \pm 5,88\%$ e $8,05 \pm 3,73\%$, respectivamente) ($P < 0,05$).

5.2 Experimento II: Avaliação da qualidade da capacitação espermática pela produção de blastocistos *in vitro*

A análise de variância mostrou que houve diferença ($P < 0,05$) na produção *in vitro* de embriões (PIV), para os tratamentos, após capacitação por 30 min (figura 03).

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre a porcentagem de embriões clivados no controle em que os espermatozoides utilizados foram capacitados com heparina na presença de COC ($78,01 \pm 3,19\%$), e nos tratamentos em que foram capacitados na ausência de COC com L-arg+hep ($82,16 \pm 3,54\%$) ou heparina ($79,26 \pm 4,23\%$) ($P > 0,05$). Entretanto, estes grupos diferiram ($P < 0,05$) do grupo capacitado com L-arg ausência de COC ($64,38 \pm 7,27\%$) ($P < 0,05$).

A produção de blastocistos do grupo capacitado com L-arg+hep na ausência de COC ($53,71 \pm 4,14\%$) foi maior em relação ao grupo capacitado com heparina na presença de COC (controle) ($40,76 \pm 3,89\%$, $P < 0,05$), entretanto não houve diferença para o grupo capacitado com heparina na ausência de COC ($47,37 \pm 4,81\%$). O grupo capacitado com L-arg na ausência de COC apresentou a menor taxa de blastocisto ($29,98 \pm 5,39\%$), diferindo ($P < 0,05$) dos demais tratamentos.

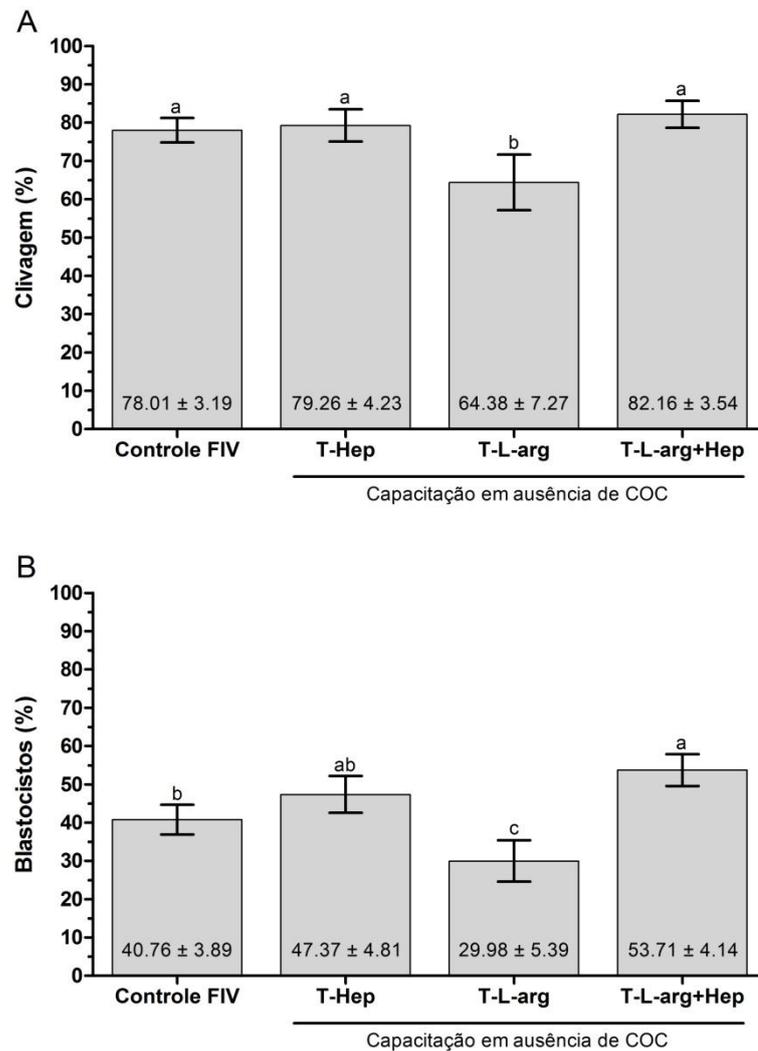


Figura3. Porcentagem de embriões clivados (A) e de blastocistos (B) em função dos tratamentos: capacitação com hep em presença de COC, capacitação com L-arg em presença de COC, capacitação com hep em ausência de COC, capacitação com L-arg em ausência de COC e capacitação com hep+L-arg em ausência de COC. Dados foram apresentados como médias ± IC (Intervalo de Confiança $P < 0.05$) de quatro repetições de quatro touros. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças, segundo o teste de Tukey ($P < 0,05$). Os números em negrito na base de cada barra representam as médias observadas em cada tratamento. $N = 2340$ COCs.

6 DISCUSSÃO

Para que ocorra a fertilização do oócito é imprescindível que haja a capacitação dos espermatozoides (PARRISH, *et al.*, 1994). Tem sido demonstrado em bovinos que o óxido nítrico tem papel fundamental neste processo (RODRIGUEZ *et al.*, 2004, 2005; LEAL *et al.*, 2009). Embora os espermatozoides sejam capazes de sintetizar o NO durante a capacitação a partir da conversão da L-arg em L-citrulina e NO pelas diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase (MONCADA e HIGGS, 1993), trabalhos recentes tem demonstrado que o aumento exógeno do NO a partir da adição de L-arg no meio capacitante, melhora a qualidade espermática de maneira dose-dependente durante a capacitação (LEAL *et al.*, 2009; JOGAN MOHANARAO e ATREJA, 2011).

O termo “capacitação em ausência do COC” foi utilizado em nosso estudo para descrever o processo em que os espermatozoides são mantidos em meio capacitante com os respectivos tratamentos por um período de 30 min, antes do co-cultivo com os COCs (no caso do uso dos mesmos para PIV de embriões), ou antes, de serem submetidos aos testes espermáticos (Fukui *et al.* 1990). Sabe-se que no ambiente *in vivo*, o processo de capacitação ocorre ao longo do trato reprodutor feminino, principalmente na tuba uterina, onde é observado um reservatório de espermatozoides, e onde os mesmos são capacitados, permitindo-lhes tornarem-se férteis até o momento em que o COC alcança a tuba uterina (HUNG e SUAREZ, 2012). Desta maneira, nosso objetivo foi avaliar o efeito da L-arg na capacitação *in vitro* de espermatozoides em presença da heparina antes do co-cultivo com os COCs (FIV).

Foi observado no presente estudo que a adição de 1mM de L-arg ao meio de capacitação contendo heparina aumentou o percentual de espermatozoides capacitados e manteve baixo o percentual de espermatozoides que apresentaram reação acrossômica. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os obtidos por Leal (2012) que observou resultados semelhantes às 4 h de capacitação. O papel do NO na qualidade dos espermatozoides capacitados foi também demonstrado por Leal *et al.* (2009) onde observaram que o bloqueio da síntese de NO no meio capacitante após a adição de L-NAME, promoveu uma diminuição na

qualidade espermática e capacitação, diminuindo o número de oócitos homólogos penetrados. FERREIRA-BERBARI *et al.* (2010) avaliaram o efeito de diferentes concentrações da aminoguanidina (AG), inibidor específico da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), na qualidade espermática (motilidade, vigor e integridade da membrana plasmática), na atividade mitocondrial e na capacitação de espermatozoides bovinos após 5 h de cultivo. Estes autores observaram que a inibição da síntese de NO pela AG diminuiu a percentagem de oócitos penetrados, reforçando assim o papel do NO na qualidade espermática ao longo da capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos.

A heparina tem sido considerada a principal substância que promove a capacitação espermática *in vitro* em bovinos (PARRISH *et al.*, 1988; CHAMBERLAND *et al.*, 2001). Segundo PAES de CARVALHO *et al.* (2002), apenas 30% dos espermatozoides bovinos capacitaram na ausência de heparina após 4 h de incubação, sendo esta avaliada pelo teste de penetração em oócitos homólogos. RODRIGUEZ *et al.* (2011) demonstraram que a capacitação induzida pela heparina aumenta o consumo de O₂ após 45 min de incubação. Desse consumo, 19% foram utilizados para produzir NO. Como em nosso experimento a adição de L-arg+hep no meio capacitante apresentou a taxa de capacitação mais elevada avaliada pelo teste de CTC, e maior produção de embriões *in vitro*, superando a capacitação somente com heparina em ausência de COC, pode-se sugerir que a adição exógena de L-arg, precursora da síntese de NO, pode estar aumentando a concentração de NO no meio capacitante, no qual seus efeitos na capacitação podem estar sendo somados aos efeitos da heparina.

Tem sido demonstrado em humanos que o mecanismo pelo qual o NO modula a capacitação espermática ocorra pela ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) que aumenta a produção de GMPc intracelular (MIRAGLIA *et al.*, 2007; MIRAGLIA *et al.*, 2011). Zhang (2007) concluiu que a capacitação induzida pelo NO e a reação acrossomal de espermatozoides humanos, são mediadas pela via NO/GMPc/PKG. Assim, o GMPc é responsável por aumentar a concentração de AMPc via ativação de canais de potássio (K⁺) no interior dos espermatozoides (COOK e BABCOCK, 1993). Esse aumento é responsável por ativar a cascata que leva à fosforilação de proteínas principalmente no resíduo tirosina da proteína cinase A (PK-A) (GALANTINO-HOMER *et al.* 1997), tirosina cinase (PTK), fosfotirosina

fosfatase (Ptyr-Ptase) (VISCONTI, *et al.* 1995), piruvato desidrogenase, subunidade beta da ATP-sintase (JAGAN MOHANARAO e ATREJA, 2012) e tem sido citada como de papel crucial na capacitação, reação acrossômica e penetração do espermatozoide em diferentes espécies de mamíferos (LECLERC *et al.*, 1992; NASSAR *et al.*, 1999; ROY e ATREJA, 2008). Essa fosforilação induzida pelo NO já foi descrita em espermatozoides de rato (VISCONTI *et al.*, 1995), humano (EMILIOZZI e FENICHEL, 1997) e bovino (VISCONTI *et al.* 1995; GALANTINO-HOMER *et al.*, 1997; CHAMBERLAND *et al.*, 2001). Mais estudos são necessários para se avaliar se o efeito da adição de L-arg no meio capacitante com heparina de espermatozoides de bovinos ocorre por esta via usando este método de capacitação utilizado no presente trabalho.

No presente estudo, não foi observada diferença na percentagem de membrana plasmática e membrana acrossomal integras após os diferentes tratamentos de capacitação em ausência de COC por 30 min. Entretanto, o tratamento de capacitação somente com heparina apresentou a maior taxa de MP e MA lesadas. O fato dos grupos com L-arg e L-arg+hep terem apresentado menores taxas de membranas lesadas pode ser devido ao aumento do NO, tendo este um efeito citoprotetor contra lesões de membranas no espermatozoide ao longo da capacitação, sugerindo que o espermatozoide utiliza a L-arg exógena para produzir o NO ao invés de retirar da sua própria membrana, preservado assim a sua constituição (LEAL, 2012). Além disso, o NO é o limitador da peroxidação lipídica, agindo como uma espécie de terminação para a reação, alterando a reatividade de metais conhecidos para servir como catalisadores para sua geração (RUBBO *et al.*, 1996). Ele ainda está envolvido na prevenção de alguns processos apoptóticos após a ativação de guanilato ciclase solúvel (ESTEVEZ *et al.*, 1998). Este efeito citoprotetor do NO também foi demonstrado por Ferreira-Berbari *et al.* (2010) em espermatozoides bovinos *in natura*.

No processo de produção *in vitro* de embriões não foi observada diferença na taxa de clivagem nos grupos capacitados em heparina na presença e ausência de COC e L-arg+hep na ausência de COC, corroborando com os resultados obtidos por Silva (2010) e Leal (2012). Entretanto, houve diferença na taxa de blastocistos nos grupos capacitados com L-arg+hep (31,8%) e com hep (16,2%) na ausência de COC quando comparados ao controle, fato que pode ter ocorrido devido ao maior número

de espermatozoides capacitados e ao aumento da qualidade espermática nesses tratamentos. Esse dado extrapolado para o ambiente comercial garante enorme benefícios ao produtor e ao laboratório, como a maior oferta de embriões e a diminuição do custo por embrião produzido *in vitro*, podendo assim favorecer a disseminação dessa técnica para produtores de menor poder de investimento.

O resultado encontrado na taxa de blastocistos confirma a importância do NO na qualidade espermática (LEAL *et al.*, 2009; FERREIRA-BERBARI *et al.*, 2010) e seu impacto na produção *in vitro* de embriões corroborando com os achados de Leal (2012). Entretanto, esses efeitos são obtidos somente quando há a associação da heparina com o precursor da síntese de NO, pois a capacitação somente com L-arg não alcançou a mesma qualidade que a observada com a capacitação com L-arg+hep, visto que a taxa de clivagem e produção de blastocisto foi menor.

Esse método de capacitação espermática realizado em ausência do COC se mostrou eficaz na avaliação dos diferentes tratamentos na capacitação, pois com a retirada dos tratamentos com Talp-Chamberland após o período de 30 min, não houve influência da L-arg e/ou heparina nos oócitos durante a fertilização. Dessa forma, sugere-se que este método seja utilizado na avaliação da influência de outras substâncias na capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos e seu impacto na produção de embriões. Mais estudos são necessários para avaliar se a ausência da heparina no meio de fertilização *in vitro* apresenta efeito benéfico na produção de embriões.

Patel *et al.* (1998) observaram que a L-arg em pequenas concentrações não é metabolizada, agindo somente como ativador do metabolismo nos espermatozoides, aumentando o consumo de glicose, produção de lactato e adenosina trifosfato, apresentando assim, efeito positivo na motilidade dos espermatozoides (KELLER e POLAKOSKI, 1975). Além disso, Kim *et al.* (2011) demonstraram que a L-arg serve de substrato para a síntese de poliaminas via ornitina descarboxilase, tendo atuação principalmente na estabilização de membranas de conceptos ovinos. Mais estudos são necessários para se avaliar estas possíveis vias de ação da L-arginina no espermatozoide bovino durante a capacitação, além da via L-arg/NO/GMPc (LEAL, 2012), com reflexo no aumento da produção de blastocistos *in vitro* em bovinos.

7.CONCLUSÕES

Os resultados do presente experimento nos permitem concluir que capacitação prévia dos espermatozoides em presença de L-arg+hep em ausência de COCs, seguida pela co-incubação com oócitos maturados *in vitro*, aumentou a taxa de capacitação e a produção de blastocistos sendo indicado o seu uso na rotina dos protocolos de fertilização *in vitro*.

8. REFERÊNCIAS

ALBANEZ, J. R. Brasil como maior exportador mundial de carne bovina: conquistas e desafios. **VII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal**, São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2008. Anotações de palestra.

ALLAN, G. J.; FLINT, D. J.; PATEL, K. Insulin-like growth factor axis during embryonic development. **Reproduction**, v. 122, p. 31–39, 2001.

AOYAGI, Y.; FUJII, K.; IWAZUMI, Y.; FURUDATE, M.; FUKUI, Y.; ONO, H. Effect of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 30, p. 973-985, 1988.

AUSTIN, C. R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 581–596, 1951.

BAILEY, J. L. Factors Regulating Sperm Capacitation – review and hypothesis. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 56, p. 334-348, 2010.

BALERCIA, G.; MORETTI, S.; VIGINI, A.; MAGAGNINI, M.; MANTERO, F.; BOSCARO, M.; RICCIARDO-LAMONICA, G.; MAZZANTI, L. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 245-249, 2004.

BÁRÁNDI, Z.S.; SOLTI, L.; CSEH, S.; VARGA, Z.S.; MACHÁTY, Z.; VAJTA, G. Comparison of the in vitro fertilizing ability of sperm from endangered Hungarian Grey bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 31, p. 13-19, 1993.

BARUSELLI, P. S.; de SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; SALES, J.N.S.; AYRES, H.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; ARRUDA, R. P. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, p.374-381, 2007.

BERMEJO-ÁLVAREZ, P.; RIZO, D.; RATH, D.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Can bovine in vitro matured oocytes selectively process X- or Y-sorted sperm differentially? **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 594-597, 2008.

BEVERS, M.M.; IZADYAR, F. Role of growth hormone and growth hormone receptor in oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, p 173-178, 2002.

BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V.; MORIN, M.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v. 71, p. 30-38, 2009.

BODMER, M.; JANETT, F.; HÄSSIG, M.; den DAAS, N.; REICHERT, P.; THUN, R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, v. 64, p. 1647-1655, 2005.

BOE-HANSEN, G.B.; MORRIS, I.D.; ERSBOLL, A.K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, p. 1789-1802, 2005.

BONI, R.; GUALTIERI, R.; TALEVI, R.; TOSTI, E. Calcium and other ion dynamics during gamete maturation and fertilization. **Theriogenology**, v. 68, p. 156-164, 2007.

BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLO, S.; DALE, B. Intracellular communication in in vivo and in vitro-produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1050-1055, 1999.

Brasil em números = Brazil in figures / IBGE. Centro de Documentação e Disseminação de Informações. - Vol. 22 - Rio de Janeiro: IBGE, 2014. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2/bn_2014_v22.pdf. . Acesso em 10 de janeiro de 2015.

BREININGER, E.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T. Capacitation inducers act through intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. **Theriogenology**, v. 74, p. 1036-1049, 2010.

BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; BAUER, J. E.; MACPHERSON, M. L.; VARNER, D. D. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. **Animal Reproduction Science**. v. 45, p. 65-71, 2007.

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 74, p. 1521-1530, 2010.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBNIS, E.Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v.14, p. 289–297, 1993.

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

CERCHIARO, I.; CASSANDRO, M.; Dal ZOTTO, R.; CARNIER, P.; GALLO, L. A field study on fertility and purity of sex-sorted cattle sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2538-2542, 2007.

CHAMBERLAND, A.; FOURNIER, V.; TARDIF, S.; SIRARD, M.A.; SULLRVAN, R.; BARLEY, J.L. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 55, p. 823-835, 2001.

CHANG, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. **Nature**, v.168, p. 697–698, 1951.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 2a ed, Belo Horizonte, 49p., 1998.

COOK, S.P.; BABCOCK, D.F. Selective modulation by cGMP of the K⁺ channel activated by speract. **J. Biol.Chem**, v. 268, p. 22402–22407, 1993.

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

CROCOMO, L.F.; MARQUES FILHO, W.C.; LANDIM ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S.D. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção in vitro de embriões ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, p.25-31, 2012.

CROSS, N. L. Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1129-1134, 2000.

COHEN-DAIAG, A., TUR-KASPA, I., DOR, J., MASHIACH, S., EISENBACH, M. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic

responsiveness to follicular factors. **Porci. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 92: 11039-11043, 1995.

de LAMIRANDE, E., HAKAKAT, A., GAGNON, C. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. **Journal of Andrology**, v. 19, p. 215-225, 1998.

de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v. 10, p. 12-21, 1995.

de LAMIRANDE, E., LECLERC, P., GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 3, p. 175- 193, 1997.

de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 21-25, 1993.

de LAMIRANDE, E.; LAMOTHE, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation, **Free Radical Biology and Medicine**. v. 46, p. 502-510, 2008.

de LAMIRANDE, E.; O' FLAHERTY, C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. **Biochimica et Biophysica Acta, Proteins Proteomics**, v. 1784, p. 106-115, 2008.

de LOOS, F.; VAN VILET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T.A. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v. 24, p. 197-204, 1989.

DIXIT, V.D., PARVIZI, N. Nitric oxide and the control of reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p.1-6, 2001.

DONNELLY, E.T.; LEWIS, S. E. M.; THOMPSON, W.; CHAKRAVARTHY, U. Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 755-762, 1997.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.

DUSTING, G.J.; MacDONALD, P.S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. **Annals of Medicine**, v. 27, p.395-406, 1995.

EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M.A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, p. 84–96, 2006.

EMILIOZZI, C. e FENICHEL, P. Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm *in vitro* but is not sufficient for its completion. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 674-679, 1997.

ESPEY, M.G., MIRANDA, K.M., FEELISCH, M. *et al.* Mechanisms of cell death governed by the balance between nitrosative and oxidative stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2000.

EVANS, J. P.; FLORMAN, H. M. The state of the union: the cell biology of fertilization. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. 57–63, 2002.

FAIR, T.; HULSHOF, S.C.; HYTTEL, P.; GRÈVE, T.; BOLAND, M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Molecular Reproduction Development**, v. 46, p.208, 1997

FERREIRA-BERBARI, J.B.P; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C; PAES DE CARVALHO, C.S; VINA, K. S.; LEAL, A.C.S.M.; QUIRINO, C.R. Efeito da inibição da óxido nítrico sintase induzível na capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 511-520, 2010.

FEUGANG, J.M.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KAYA, A.; WANG, H.; PAGE, G.; OSTERMEIER, G.C.; TOPPER, E.K.; MEMILI, E. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 21, p. 312– 324, 2010. Disponível em: [http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)00403-7/abstract](http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)00403-7/abstract). Acesso em: 01 de abril de 2014.

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

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 265-271, 2000.

FORD, C. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v. 10, p. 387-399, 2004.

FRANCAVILLA, F.; SANTUCCI, R.; MACEROLA, B.; RUVOLO, G.; ROMANO, R. Nitric Oxide synthase inhibition in human sperm affects sperm-ooocyte fusion but not zona pellucida binding. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 425-429, 2000.

FRASER, L. R. Ionic control of sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 905-925, 1995.

GALANTINO-HOMER, H.L., VISCINTI, P.E., KOPF, G.S. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent pathway. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 707-719, 1997.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Journal of Reproduction Science*, v. 42, p. 371-379, 1996.

GERHARDT, B.T.; SINEDINO, L.D.P.; DOURADO, A.P.; ALVES, P.A.M.; NOGUEIRA, L.A.G. Taxa de concepção com sêmen sexado ou convencional e viabilidade econômica em vacas Girolandas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, p.128-132, 2012.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, F. S.; BARRETTO, L. S. S.; ARRUDA, R. P.; PERRI, S. H. V.; MINGOTI, G. Z. Heparin and penicillamine-hypotaurine-epinephrine (PHE) solution during bovine *in vitro* fertilization procedures impair the quality of spermatozoa but improve normal oocyte fecundation and early embryonic development. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 50, p. 39–47, 2014.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.;

FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela Editora e Livaria Ltda. Cap. 10, p. 195-226, 2002.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

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

GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of Equine Sperm Mitochondrial Function Using JC-1, **Theriogenology**, v. 53, p. 1691-703, 2000.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G.B.; MEDRANO, J.F.; MURRAY, J.D. Relationship between stage of development and sex of bovine IVM-IVF embryos cultured in Vitro versus in the sheep oviduct. **Theriogenology**, v. 46, p. 515-525, 1996.

GWATHMEY, T.M., IGNOTZ, G.G., SUAREZ, S.S. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 809-15, 2003.

HANADA, A., In vitro fertilization in cattle with particular reference to sperm capacitation by ionophore A-23187. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v. 31, p. 56-61, 1985.

HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle - an overview. **Theriogenology**, v. 65, p. 119-125, 2006.

HELLSTRON, W.J.G.; BELL, M.; WANG, R.; SIKKA, S.C. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. **Fertility and Sterility**, v. 61, p. 117-1122, 1994.

HERRERO, M.B.; CEBRAL, E.; BOQUET, M.; VIGGIANO, J.M.; VITULLO, A.; GIMENO, M.A.F. Effect of nitric oxide on mouse sperm hyperactivation. **Acta Physiologica, Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana**, v. 44, p. 65-69, 1994.

- HERRERO, M.B.; VIGGIANO, J.M.; PEREZ MARTINEZ, S.; GIMENO, M.F. Evidence that nitric oxide synthase is involved in progesterone-induced acrossomal exocytosis in mouse spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 433-439, 1997.
- HILLERY, F.L.; PARRISH, J.J.; FIRST, N.L. Bull Specific Effect on Fertilization and Embryo Development in Vitro. **Theriogenology**, v. 33, p.249, 1990.
- HO, H. C.; SUAREZ, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v. 122, p. 519–526, 2001.
- HOU, M. L.; HUANG, S. Y.; LAI, Y. K.; LEE, W. C. Geldanamycin augments nitric oxide production and promotes capacitation in boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p.56-68, 2008.
- HUNG, P-H., SUAREZ, S.S. Alterations to the bull sperm surface proteins that bind sperm to oviductal epithelium. **Biology of Reproduction**. v. 87 (4): 88, p. 1-11, 2012.
- HYTTEL, P.; VIUFF, D.; FAIR, T.; LAURINCIK, J.; THOMSEN, P.D.; CALLESEN, H.; VOS, P.L.; HENDRIKSEN, P.J.; DIELEMAN, S.J.; SCHELLANDER, K.; BESENFELDER, U.; GRÈVE, T. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 122, p. 21, 2001
- HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23 – 32, 1997.
- IETS. Certification and identification of the embryo. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Eds.). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy, IL, USA: IETS, p.103-116, 1998.
- IGNARRO, L. J. **Nitric oxide, biology and pathobiology**. San Diego, Estados Unidos: Academic press. 2000.
- JAGAN MOHANARAO, G.; ATREJA, S.K. Identification of NO induced and capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 618-623, 2012.
- JAISWAL, B.S., COHEN-DAYAG, A., TUR-KASPA, I., EISENBACH, M. Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both parcial and complete acrossome reaction. **FEBS Letters** 427: 309-313, 1998.

JAMIL, H.; SAMAD, H.A.; QURESHI, Z.I.; REHMAN, N.; LODHI, L.A. Effect of bull and sperm preparation method on in vitro fertilization of buffalo oocytes. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 27, p. 29-34, 2007.

LACALANDRA, G.M. In vitro fertility test of bull semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12. The Hague. **Proceedings...**, v.2, p.656-658, 1992.

LAMBERT, R. D.; SIRARD, M. A.; BERNARD, C.; BELAND, R.; The fertilization performance of bovine and rabbit spermatozoa capacitated in vitro. **Proceedings 10th Intern. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem.**, Illinois, USA, 3: 292. 1984.

LEAL, A.C.M.S. **Aumento da produção in vitro de embriões bovinos: Papel da via L-arg/NO/GMPc no aumento da qualidade espermática após capacitação.** Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 162p. 2012.

LEAL, A.C.M.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C.; PAES de CARVALHO, C. S., VIANA, K. S., QUIRINO, C. S. Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced in vitro capacitation. **Animal Reproduction Science**, v. 116, p. 38-49, 2009.

LEE, H.L.; KIM, S.H.; JI D.B.; KIM, Y.J. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, p. 249–255, 2009.

LECLERC, P., SIRARD, M.A., CHAFOULEAS, J.G., LAMBERT, R.D. Decrease in calmodulin concentrations during heparin-induced capacitation in bovine spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 94, p. 23-32, 1992.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, **Methods**, v. 25, p 402-408, 2001.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p.137-152, 2006.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, p. 17-22, 2008.

LONERGAN, P.; FAIR, T. The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. **Theriogenology**, v. 81, p. 49–55, 2014.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M. P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 159–167, 1999.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MOREIRA, P. M.; PINTADO, B.; DE LA, F. J. ; BOLAND. M. P. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 69, p.1424-1431, 2003.

LONERGAN, P. The application of in vitro fertilization techniques to the prediction of bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 29, p.12-21, 1994.

LU, K.H.; SEIDEL Jr, G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically sorted sperm. **Theriogenology**, v. 62, p. 819-830, 2004.

MACHATKOVA, M.; HULINSKA, P.; RECKOVA, Z.; HANZALOVA, K.; SPANIHELOVA, J. ; POSPISIL, R. In vitro production of embryos from high performance cows and the development of frozen-thawed embryos after transfer: a field study. **Veterinarni Medicina**, v. 53, p. 358-364, 2008.

MACIEL-JÚNIOR, V. L. **A capacitação de espermatozoides bovinos induzida pela via L-arg/NO/GMPc e seus reflexos na expressão gênica de embriões produzidos in vitro**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norde Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 66 p., 2014.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, p.927-30, 1994.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **Journal of Biology and Chemistry**, 268, p.12231-12234, 1993.

MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. Evaluation of bull semen fertility by homologous in vitro fertilization tests. **Reproduction Nutrition Development**, v.30, p.259-266, 1990.

MARQUES, C.C.; BAPTISTA, M.C.; PEREIRA, R.M.; VASQUES, M.I.; LOPES da COSTA, L.F.; HORTA, A.E.M. Influência do sêmen de diferentes touros sobre as taxas de fertilização *in vitro* e desenvolvimento de embriões em co-cultura. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, Ano II, 1995.

MEMILI, E.; DOMINKO, T.; FIRST, N.L. Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 36, 1998.

MEMILI, E.; FIRST, N.L. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1198–1207, 1999.

MENDES-JUNIOR, J.; BURNS, P.; SANCHES, J.D., SEIDEL-JUNIOR, G. Effects of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, v. 60, p. 331-340, 2003.

MEO, S. C. Interação núcleo-citoplasmática em embriões e Expressão de genes “*imprinted*” em fetos bovinos produzidos *in vivo*, *in vitro* e partenogênicos. 2005, 94f. Tese (doutorado) - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2005.

MERMILLOD, P.; MASSIP, A.; DESSY, F. In vitro production of cattle embryos: review and Belgian results. **International Journal Developmental Biology**, v. 36, p. 185 à 195, 1992.

MILLER, D. J.; HUNTER, A. G. Individual variation for in vitro fertilization success in dairy bulls. **Journal of Dairy Science**. v. 70, p. 2150-2153, 1987.

MIRAGLIA, E.; de ANGELIS, F.; GAZZANO, E.; HASSANPOUR, H.; BERTAGNA, A.; ALDIERI, E.; REVELLI, A.; GHIGO, D. Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway. **Reproduction**, v. 141, p. 47-54, 2011.

MONACO, E. E.; GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; DeROSA, A.; ATTANASIO, L.; ZICARELLI, L.; KILLIAN, G. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, 71, p.450-457, 2008.

MONCADA, S. *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v.43, p.109-42, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 2002-2012, 1993.

MORTON, K.M.; HERRMANN, D.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W.M.C.; RATH, D.; EVANS, G.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p. 931-940, 2007.

NASSAR, A.; MAHONY, M.; MORSHEDI, M.; LIN, M.H. SRISOMBUT, C.; OEHNINGER, S. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. **Fertil. Steril.** v. 71, p.919-923, 1999.

NAUC, V., MANJUNATH, P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons) and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1058-1066, 2000.

NEILD, D. N.; GADELLA, B. M.; AGÜERO, A.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 47-56, 2005.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alteration of expression of developmentally important genes in pre implantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v.53, p. 21, 2000.

NORMAN, J.E.; CAMERON, I.T. Nitric oxide in the human uterus, **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 61-68, 1996.

NORMAN, H.D.; HUTCHISON, J.L.; MILLER, R.H. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the united States. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.3880-3890, 2010.

O'BRYAN, M. K et al. Human sperm endothelial nitric oxide syntase expression: correlation with sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 70, p.1143-1147, 1998.

O'FLAHERTY, C., RODRIGUEZ, P., SRIVASTAVA, S. L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1674, p. 215-221, 2004.

O'FLAHERTY, C.; BEORELGUI, B.; BECONI, M. T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 52, p. 289-301, 1999.

OSHIO, S. Apparent densities of spermatozoa of various mammalian species. **Gamete Research**, v. 20, n. 2, p. 159-164, 1988.

OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; KONDO, S.; SUZUKI, T. Effects of different lots of sêmen from the same bull on in vitro development of bovine oocytes fertilized in vitro. **Theriogenology**, v. 39, p. 713-718, 1993.

PAES de CARVALHO, C.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C.; CARVALHO, F. P.; UENO, V. G.; QUIRINO, C. R. Efeito do óxido nítrico na capacitação in vitro induzida ou não pela heparina em espermatozoide bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 516, 2003.

PALMA, G. A.; OLIVIER, N. S.; NEUMÜLLER, Ch.; SINOWATZ, F. Effects of Sex-sorted Spermatozoa on the Efficiency of in vitro Fertilization and Ultrastructure of in vitro Produced Bovine Blastocysts. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 37, p. 67-73, 2008.

PALMA, G. A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 33, p. 257-262, 2004.

PALMA, G. Producción *in vitro* de embriones. In: PALMA, G. **Biotecnología de la reproducción**, Argentina, 1 ed. Inta Editora, 701 p., 2001.

PARINAUD, J., MILHET, P. Progesterone induces Ca-dependent 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate increase in human sperm. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, p. 1357-1360, 1996.

PARRISH, J.J.; EID, L. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 1232-1237, 1994.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., UGUZ, C., FIRST, N.L. Differences in the role of cyclic adenosine 3` 5` - monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 1099-1108, 1994.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.

PEIPPO, J.; RATY, M.; KORHOMEN, K.; ERONEN, M.; KANANEN, K.; TURME, T.; HALMEKYTO, M.; MAKI-TANILA, A. Impact of in vitro fertilization of bovine oocytes with sex-sorted frozen-thawed spermatozoa on developmental kinetics, quality and sex ratio of developing embryos. **Zygote**, v. 18, p. 185-194, 2010.

PUGLISI, R.; VANNI, R.; GALLI, A.; BALDUZZI, D.; PARATI, K.; BONGIONI, G.; CROTTI, G.; DUCHI, R.; GALLI, C.; LAZZARI, G.; ALEANDRI, R. In vitro fertilization with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometric and validated for accuracy by real-time PCR. **Reproduction**, v. 132, p. 519-526, 2006.

RÊGO, J.P. **Análise proteômica do plasma seminal de carneiros Santa-Inês adultos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Fortaleza – CE, Universidade Federal do Ceará – UFC, 107p., 2010.

RETTORI, V.; MCCANN, S.M. Role of nitric oxide and alcohol on gonadotropin release in vitro and in vivo. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 185-193, 1998.

REVELLI, A., COSTAMAGNA, C., MOFFA, F., ALDIERI, E., OCHETTI, S., BOSIA, A., MASSOBRIO, M., LINDBLOM, B., GHIGO, D. Signaling pathways of nitric oxide-induced acrosome reaction in human sperm. **Biol. Reprod.**, v. 64, p.1708-1712, 2001.

RHEMREV, J., JEYENDRAN, R.S., VERMEIDEN, J.P., ZANEVELD, L.J. Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. **Fertil Steril**, v. 51, p. 685–690, 1989.

RICART-JANÉ, D.; LOBERA, M.; LOPEZ-TEJERO, M.D. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. **Nitric Oxide**, v. 6, p. 178-185, 2002.

RODRIGUEZ, P.C.; O'FLAHERTY, C.M.; BECONI, M.T.; BEORLEGUI, N.B. Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 231-242, 2004.

RODRIGUEZ, P.C., O'FLAHERTY, C.M., BECONI, M.T. et al., (2005) Nitric oxide induces acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia*. v. 37, p. 166-172, 2005.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, Goiânia, GO. **Anais: Palestras**. 2005.

RODRIGUEZ, P.C.; VALDEZ, L.B.; ZAOBORNÝ, T.; BOVERIS, A.; BECONI, M.T. Nitric oxide and superoxide anion production during heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 74-81, 2011.

ROSENKRANZ, C., HOLZMANN, A. The effect of sperm preparation on the timing of penetration in bovine in vitro fertilization. **Animal Reprod. Sci.** v. 46, p. 47-53, 1997.

ROY, S.C.; ATREJA, S.K. Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation starts early in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa as compared to cattle, **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 319–325, 2009.

ROY, S. C., ATREJA, S. K. Tyrosine phosphorylation of a 38-kDa capacitation-associated buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm protein is induced by L-arginine and regulated through a cAMP/PKA-independent pathway. **International Journal of Andrology**, v. 31, p. 12-24, 2008.

RUBBO, H.; DARLEY-USMAR, V.; FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 9, p. 809-820, 1996.

SAACKE, R.G.; NADIR, S.; NEBEL, R.L. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. **Theriogenology**, v. 41, p. 45-50, 1994.

SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; CRAN, D.G.; SEIDEL Jr, G.E. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, p. 1375-1391, 1999.

SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; SEIDEL Jr, G.E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 299-307, 2005.

SEIDEL Jr, G.E.; SCHENK, J.L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 129-138, 2008.

SEIDEL Jr., G. E. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. **Theriogenology**, v. 59, p. 585-598, 2003.

SENGOKU, K.; TAMATE, K.; YOSHIDA, T.; TAKAODA, Y.; MIYAMOTO, T.; ISHIKAWA, M. Effects of low concentration of nitric on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 69, p. 522-527, 1998.

SHANSUDDIN, M., LARSSON, B. In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. **Reproduction in Domestic Animals**, v.28, p.77-84, 1993.

SHI, D.S.; LU, K.H.; GORDON, I. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. **Theriogenology**, v. 33, p. 324, 1990.

SHIDU, K.S.; GURAYA, S. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Int Rev Cytol**, v. 118, p. 231-280, 1989.

SHIRAZI, A.; SHAMS-ESFANDABADI, N.; HOSSEINE, S.M. A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. **Small Ruminant Research**, v.58, p.283-286, 2005.

SILVA, R.T. **Correlação da morfometria e da compactação da cromatina de espermatozoides de touro zebuino sobre a taxa de clivagem e formação de blastocistos em programas de produção in vitro**. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Uberlândia – MG, Universidade Federal de Uberlândia, 37p, 2006.

SILVA, T. V. G. **Uso da L-arginina nos processos de capacitação espermática e fecundação in vitro de oócitos bovinos**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, Belém, 2010.

SINOWATZ, F. Fertilização. *In*: HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia Veterinária**. Rio de Janeiro – Elsevier, cap. 5, pag. 56 – 67, 2012.

SIRARD M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2000.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.

STEIN, D.M.; FRASER, L.R. Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation *in vitro*. **Gamete Research**. V. 10, p. 283-299, 1984.

STROUD, B.; CALLESEN, H. Declaração sobre estatísticas mundiais de transferência de embriões para 2010. **Anais da XXVI reunião anual da sociedade brasileira de tecnologia de embriões**, Foz de Iguaçu, p. 111, 2012.

STROUD B. IETS 2012 Statistics and Data Retrieval Committee Report. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 30, p.15–26, 2012.

TAMASSIA, L. F. M.. E a reprodução animal, como fica? **Noticiário Tortuga**, São Paulo, Ano 52, 453, p.41, setembro/outubro, 2007.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 62, p. 1245-1252, 2004.

THERIEN, I.; SOUBEYRAND, S.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein, **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1080-1088, 1997.

THIBAUT, C., SZOLLOSI, D. GERARD, M. Mammalian oocytes maturation. **Reproduction Nutrition Development**. v. 27, p. 865 – 896, 1987.

TOPPER, E. K., KILLIAN, G. J., WAY, A., ENGEL, B.; WOELDERS, H. Influence of capacitation and fluids from the male and female genital tract on the zona binding ability of bull spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility** , v. 115, p. 175–183, 1999.

TOSIC, J.; WALTON, A. Metabolism of spermatozoa: the formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival. **Biochemical Journal**, v. 47, p. 199-212, 1950.

UNDERWOOD, S.L.; BATHGATE, R.; PEREIRA, D.C.; CASTRO, A.; THOMSON, P.C.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Embryo production after *in vitro* fertilization with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen bull sperm. **Theriogenology**, v.73, p. 97-102, 2010.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, p.100-109, 2008.

VEECK, L.L. **An Atlas of Human Gametes and Conceptuses**. New York, USA. Ed. Patheron Publishing, 215 p. 1998.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction**, v.9, n.1, p.12-18, 2012.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1-6, 1998.

VISCONTI, P.E., BAILEY, J.L., MOORE, G.D., PAN, D., OLDS-CLARKE, P., KOPF, G.S. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **Development**, v. 121, p. 1129-1137, 1995.

VRENDENBURGH-WILBERG, W.L., PARRISH, J.J. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 40, p. 490-502, 1995.

WATANABE, Y.F.; de LOS REYES, A.B.; OLIVEIRA FILHO, E.B. Efeito do grupo genético de reprodutores na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, n.3, p.237, 1994.

WATANABE, Y.F.; OLIVEIRA FILHO, E. B. Efeito de reprodutores, distribuídos em três grupos genéticos, na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Ars Veterinária**, v. 16, p. 22-27, 2000.

WATANABE, Y.F.; OLIVEIRA FILHO, E. B. Efeito de touros na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Zootecnia**, v. 32, p. 237, 1994.

WATANABE, Y.F.; WATANABE, M.R.; AZAMBUJA, R.M.; PERIPATO, A.C.; VILA, R.A.; GALERANI, M.A.V.; LÔBO, R.B. Efeito de touros na produção *in vitro* de embriões com diferentes concentrações de heparina e de espermatozoides. **Arquivos da Faculdade de Veterinária - UFRGS**, v.24, p.250, 1996.

WATSON, A.J. The cell biology of blastocyst development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 33, p. 492–504, 1992.

WHEELER, M.B.; RUTLEDGE, J.J.; FISCHER-BROWN, A.; VANETTEN, T.; MALUSKY, S.; BEEBE, D.J. Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 219-227, 2006.

WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, p. 434-56, 1998.

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

WOLF, A. **Estímulo da síntese de glutathiona na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, Botucatu, 2005.

YANAGHIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil E., Neill J.D. (eds). **The Physiology of Reproduction**., vol. 1, 2^a ed. New York: Raven Press, p. 189-317, 1994.

YEOMAN, R.R.; JONES, W.D.; RIZK, B.M. Evidence of nitric oxide regulation of hamster sperm hyperactivation. **Journal of Andrology**, v. 19, p.58-64, 1998.

ZAMIR, N.; BARKAN, D.; KEYNAN, N.; NAOR, Z.; BREITBART, H. Atrial natriuretic peptide induces acrossosomal exocytosis in bovine spermatozoa. **The American Journal of Physiology**, v. 269, p. E216-E221, 1995.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Sperm characteristics and zona pellucid binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **Int. J. Androl.** v. 21, p. 207-216, 1998.

ZHANG, M.; LU, K.H.; SEIDEL Jr, G.E. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology**, v. 60, p. 1657-1663, 2003.

ZINI, A.; de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Low levels of nitric oxide promote sperm capacitation in vitro. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 424-431, 1995.

ZINI, A., O'BRYAN, M.K., MAGID, M.S., SCHLEGEL, P.N. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide syntase in human testis, epididymis, and vias deferents suggest a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 935-941, 1996.

9. ANEXOS

9.1 Sondas Fluorescentes para Avaliação de Membranas Espermáticas

Celeghini, 2005

Coloração Tripla

1. Iodeto de Propídio (IP)

1.1 Solução Estoque de IP: 25nmg/ml

1.1.1 IP (Sigma) – 25 mg

1.1.2 DMSO (Sigma ...) – 1,0 ml

1.2 Solução de Trabalho de IP: 0,5 mg/ml

1.2.1 Solução Estoque de IP: 5ml

1.2.2 Solução de Trabalho: PBS ou Talp-sp seg Chamberland, 2001 – 245 µl

Aliquotar as soluções , proteger da luz e estocar a -20°C.

1.3 Solução de Uso: 3 µl da solução de trabalho : 150 µl da solução de sptz em Talp-sp seg. Chamberland, 2001

2. Hoescht 33342

2.1 Solução Estoque: 40 µg/ml em PBS

2.2 Solução de Trabalho: 1µl: 999µl de PBS ou Talp-sp seg Chamberland, 2001

2.3 Solução Uso: 2 µl da solução de trabalho : 150 µl da solução de sptz em Talp-sp seg. Chamberland, 2001

3. FITC-PSA

3.1 Solução de Azida de Sódio 1%

3.1.1 Azida de Sódio (Sigma S-8032) – 0,2g

3.1.2 PBS – 20,0 ml

3.2 Solução de Trabalho de FITC-PSA (Sigma L-0770) - 100µg/ml

3.1.1 Solução de Azida de Sódio – 20 ml

3.1.2 FITC-PSA – 2,0 mg

3.1.3 Solução Uso – 50,0 µl: 150 µl da solução de sptz em Talp-sp seg. Chamberland, 2001

9.2 Coloração CTC

1.2.1 Para sêmen congelado, passar em gradiente de Percoll 45/90%. Lavar com Talp-sp seg. Chamberland ou PBS. Ressuspender o pellet e usar 50 µl de sêmen com 50 µl CTC-solução. A solução CTC deve ser feita diariamente, proteger o frasco da luz.

1.2.3 Incubar por 30'' no escuro.

1.2.4 Fixar com paraformaldeído 12,5% (w/v) em Tris-HCl pH 7.4 – 8 µl

1.2.5 Preparar lâmina com 10 a 15µl da amostra sobre a lâmina-lamínula e montar com 1 gota 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane (DABCO) (Sigma), 0,22 M.

1.2.6 Não pressionar a lâmina, alguns protocolos recomendam manter a lâmina montada em câmara úmida por até 3 horas para que os sptz parem de correr. Contar 100-200 sptz/lâmina.

1.2.7 Avaliação

F- não-capacitado com acrossoma intacto

B - capacitado com acrossoma intacto

AR- acrossoma reagido

1.3 Soluções:

1.3.1 CTC Solução

- 750 µ M CTC – 1,93 mg/ 5 ml Tris-NaCl

- 5 m M cysteina-HCl - pH 7.0 – 3 mg/5ml Tris-NaCl

- em Tris-NaCl – 20mM/130mM

Homogeneizar bem em vortex após adicionar o CTC e a L-cysteína, pois demora a diluir.

1.3.1.1. Trizma base 20 m M – 1,211 mg

$$0,02M = m(g)/121,14 \times 1L$$

$$m(g) = 0,00242 \text{ g/ml}$$

$$= 2,42 \text{ mg/ml} = 0,0242 \text{ g/10 ml}$$

1.3.1.2 NaCl 130m M

$$0,130M = m(g)/58,44 \times 1L$$

$$m(g) = 7,5972 \text{ g/1L}$$

$$7,5972 \text{ g} \text{ -----} 1000 \text{ ml}$$

$$X \text{ -----} 10 \text{ ml}$$

$$X = 0,0759 \text{ g/10ml}$$

Aliquotar e congelar.

Obs.: A solução de Tris-NaCl usando o produto Tris-NaCl da Sigma não funcionou bem, por isso optou-se por fazer uma solução usando o Trizma-base e o NaCl da Sigma.

Obs.: O pH da solução deve ser 7.4, mas a solução sempre fica com pH de aproximadamente 8.0 a 8.5. Trabalhou-se com o pH 8.0 e funcionou.

1.3.1.3. - 750 μ M CTC

1 mol _____ 515g
 0,00075M _____ m(g)
 m(g) = 0,38625g _____ 1000ml
 0,0038g _____ 10 ml
 = 3,86 mg _____ 10 ml
 = 1,93 mg _____ 5 ml

1.3.1.4. - 5mM L-cysteína

121,16g _____ 1L _____ 1M
 0,12116g _____ 1mM
 0,605800mg _____ 5mM _____ 1L
 60mg _____ 100ml
 6mg _____ 10 ml
 3mg _____ 5ml

1.3.1.5 - 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane (DABCO) (Sigma).

DABCO _____ 0,247g _____ 10mL PBS _____ pH 7.4
 Aliquotar e congelar

Obs.: A fixação realizada com paraformaldeído 3% deu resultado normal.