

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

RAPHAEL FARRUK DO AMARAL AGOSTINHO

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA PI3K NA PRESERVAÇÃO
DO SÊMEN EQUINO DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR**

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

Junho de 2016

RAPHAEL FARRUK DO AMARAL AGOSTINHO

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA PI3K NA PRESERVAÇÃO
DO SÊMEN EQUINO DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ângelo José Burla Dias.
COORIENTADOR: Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva.

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

Junho-2016

RAPHAEL FARRUK DO AMARAL AGOSTINHO

**EFEITO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA PI3K NA PRESERVAÇÃO
DO SÊMEN EQUINO DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal na área de Biotecnologia da Reprodução Animal.

Aprovada em 08 de junho de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Felipe Zandonadi Brandão (Doutor, Medicina Veterinária) – UFF

Prof. Luis Matos Fonseca (Doutor, Ciência Animal) – UENF

Prof. José Frederico Straggiotti Silva (PhD, Medicina Veterinária)- UENF
(Coorientador)

Prof. Ângelo José Burla Dias (Doutor, Ciência Animal)- UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por me dar todo apoio, suporte para que esse sonho se tornasse realidade;

Agradeço a meu pai pelo apoio, a minha Tia Marília, a meus primos João Pedro e Tomas, a meu Tio Gilbert e principalmente a minha Tia Denise e meu Tio Djalma que sempre me ajudaram e me incentivaram sendo fundamentais na minha vida;

A minha Mãe e minha Avó que foram e são essenciais na minha vida, sempre me apoiando, me ajudando em todos os momentos, pelo carinho e por tudo que fizeram e fazem por mim;

À minha namorada Camilla Xavier pelo seu companheirismo, apoio, carinho e amizade;

Ao meu professor, orientador e amigo Ângelo José Burla Dias por estar sempre disposto a me ajudar, pelos ensinamentos, pela dedicação, pela boa vontade e confiança no desenvolvimento deste projeto. Muito obrigado por acreditar em mim!

Ao meu professor, coorientador e amigo José Frederico Straggiotti Silva por sempre acreditar no meu trabalho, pela atenção, pela amizade e estar sempre solícito em me ajudar e dar conselhos;

Ao professor Eduardo Shimoda pela disponibilidade, pela atenção e realização da análise estatística deste trabalho;

Agradeço aos amigos Ronaldo Assed e Alexandre Tavares pelo apoio e por terem cedido a propriedade e os animais com a maior boa vontade, sendo responsáveis para que esse trabalho fosse possível;

Agradeço aos Técnicos de nível superior, Bruna, Carla e Fausto por me ajudarem durante o experimento;

Enfim, meu mais profundo agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do meu sonho.

RESUMO

AGOSTINHO, Raphael Farruk do Amaral. Medicina Veterinária. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Junho de 2016. Efeito da inibição da atividade da PI3K na preservação do sêmen equino da raça Mangalarga Marchador. Orientador: Prof. Dr. Ângelo José Burla Dias.

O objetivo do estudo foi verificar o efeito da inibição da atividade da enzima PI3K sobre a preservação do sêmen equino da raça Mangalarga Marchador. Para cada experimento foram utilizados cinco ejaculados, sendo um de cada garanhão. O sêmen foi suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100 nM do inibidor *wortmannin* em diluente comercial BotuSêmen®. O sêmen *in natura* foi avaliado por 2 h a 37°C. O sêmen refrigerado foi avaliado às 24, 48 e 72 h de armazenamento a 5 °C, enquanto as amostras congeladas foram avaliadas logo após o descongelamento. Amostras do sêmen *in natura* e refrigeradas foram submetidas à avaliação da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e espermatozoides com movimentos rápidos (EMR) com auxílio do programa Ceros (Hamilton Torn Research), já nas amostras descongeladas além destas avaliações foram realizadas as avaliações da atividade mitocondrial, reação acrossômica e integridade de membrana plasmática. Não foi observada alteração significativa ($P > 0,05$) na regulação da PI3K no sêmen *in natura*. No resfriamento do sêmen equino houve diferenças ($P < 0,05$) entre as concentrações do inibidor nos diversos tempos de avaliação. Nas amostras congeladas, não foram observadas alterações ($P > 0,05$) na atividade mitocondrial, e integridade das membranas plasmática e acrossomal. No entanto, houve maior percentual de células lesadas, identificadas pelo HOST, nas amostras tratadas com 50 e 100 nM do *wortmannin*. Conclui-se que a PI3K está envolvida na motilidade espermática de equinos e que, nas condições desse trabalho, a inibição da atividade da PI3K pelo *wortmannin* não melhorou a motilidade espermática.

Palavras-chave: Espermatozoide; *wortmannin*; Fosfatidilinositol-3 quinase; Congelamento; Garanhão.

ABSTRACT

AGOSTINHO, Raphael Farruk do Amaral. Veterinary Medicine. State University of Norte Fluminense. June 2016. Effect of inhibition of PI3K activity in the preservation of Mangalarga Marchador equine semen. Advisor: Prof. Dr. Angelo José Dias Burla.

The aim of the study was to evaluate the effect of inhibition of PI3K enzyme activity on the preservation of equine semen Mangalarga Marchador. For each experiment five ejaculates were used, one from each stud. Semen was supplemented with 0, 5, 10, 30, 50 and 100 nM inhibitor *wortmannin* in BotuSêmen® commercial diluent. Semen was evaluated in nature for 2 h at 37 ° C. The refrigerated semen was evaluated at 24, 48 and 72 h storage at 5 ° C, while the frozen samples were evaluated immediately after thawing. Samples of semen fresh and chilled were subjected to evaluation of total motility (MT), progressive motility (MP) and sperm with fast movements (EMR) using the Ceros program (Hamilton Torn Research), already in the thawed samples beyond these evaluations were conducted evaluations of mitochondrial activity, acrosome reaction and plasma membrane integrity. No significant change was observed ($P > 0.05$) in the regulation of PI3K in semen in natura. In the equine semen cooling there were no differences ($P < 0.05$) between the inhibitor concentrations in different times of evaluation. In frozen samples, no changes were observed ($P > 0.05$) in the mitochondrial activity and integrity of plasma and acrosomal membranes. However there was a higher percentage of damaged cells, identified by the HOST, the samples treated with 50 and 100 nM of wortmannin. Concludes that PI3K is involved in sperm motility horses and that the conditions of this study, the inhibition of PI3K activity by *wortmannin* did not improve sperm motility.

Keywords: Spermatozoon, *Wortmannin*, Phosphatidylinositol 3-kinase; Freezing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K).....	22
Figura 2. Esquema demonstrando a via de sinalização da PI3K sobre a motilidade seminal.....	24
Figura 3. Diagrama da capacitação espermática.....	26
Figura 4. Modelo da regulação da atividade da PI3K na capacitação espermática e reação acrossômica.....	27
Quadro 1. Classificação dos espermatozoides em categorias de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, detectadas pelos marcadores fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1, respectivamente.....	37
Figura 5. Percentual médio de motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides com movimentos rápidos de sêmen equino incubado por 120 minutos, a 37 °C em diluente comercial suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100 nM de <i>wortmannin</i>	38
Figura 6. Percentual médio de motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides com movimentos rápidos de sêmen equino refrigerado com 24 h de avaliação, em diluente comercial suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100nM de <i>wortmannin</i>	40
Figura 7. Percentual médio de motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides com movimentos rápidos de sêmen equino refrigerado com 48 h de avaliação, em diluente comercial suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100nM de <i>wortmannin</i>	41
Figura 8. Percentual médio de motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides com movimentos rápidos de sêmen equino refrigerado com 72 h de avaliação, em diluente comercial suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100nM de <i>wortmannin</i>	42
Figura 9. Percentual médio de motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides com movimentos rápidos de sêmen criopreservado, em diluente	

comercial suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100nM de *wortmannin*.....43

Figura 10. Percentual de espermatozoides equinos criopreservados em diluente comercial suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100nM de *wortmannin*, marcados pelo iodeto de propídio, FITC-PSA e JC1.....44

Figura 11. Efeito do congelamento do sêmen equino tratado com diferentes concentrações de *wortmannin*, sobre o percentual de espermatozoides lesados e íntegros ao teste hiposmótico.....45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS	12
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS.....	13
3.2 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO	15
3.3 A ENZIMA PI3K.....	20
3.3.1 PI3K na motilidade espermática	21
3.3.2 PI3K na capacitação espermática	23
3.3.3 PI3K na reação acrossômica	27
3.4 O <i>wortmannin</i> e a inibição da PI3K.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 ANIMAIS E LOCAL DOS EXPERIMENTOS.....	30
4.2 DESENHO DO ESTUDO.....	30
4.3 OBTENÇÃO DO SÊMEN.....	31
4.4 AVALIAÇÕES FÍSICAS DO SÊMEN.....	32
4.4.1 Volume.....	32
4.4.2 Concentração espermática.....	32
4.4.3 Motilidade dos espermatozoides	33
4.5. RESFRIAMENTO	33
4.6. CONGELAMENTO DO SÊMEN.....	34
4.7. DESCONGELAMENTO	34
4.8. TESTE HIPOSMÓTICO	34
4.9. AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS COM USO DE SONDAS FLUORESCENTES...35	
5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
6. RESULTADOS.....	37
7. DISCUSSÃO	45
8. CONCLUSÃO.....	48
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

1- INTRODUÇÃO

O complexo do agronegócio equino no Brasil movimentava cerca de R\$ 7,5 bilhões e gera cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (IBGE, 2008). Portanto, uma atividade importante para o país, tanto econômica quanto social (LIMA et al., 2006).

O aumento da importância individual dos cavalos pela popularização dos esportes equestres tem gerado novos interesses no aperfeiçoamento de tecnologia do sêmen em programas de inseminação artificial, permitindo melhorar o desempenho do garanhão na produção equina (AURICH, 2012). Apesar da melhoria em termos de desempenho reprodutivo, através da aplicação de novas tecnologias e técnicas de manejo, geradas a partir de intensas pesquisas nas últimas décadas, alguns problemas ainda permanecem. As taxas de fertilidade obtidas utilizando sêmen congelado ou resfriado de alguns garanhões permanecem menores que as obtidas com sêmen fresco variando muito os resultados entre garanhões (LOOMIS, 2001; LOVE, 2012).

Apesar do grande número de pesquisas desenvolvidas na área de criopreservação do sêmen equino, ainda não se tem um protocolo eficiente que contorne as alterações espermáticas ocorridas durante o processo de congelamento. Tais alterações resultam na redução da motilidade e viabilidade dos espermatozoides, modificações físico-químicas e estruturais de membrana plasmática e principalmente redução dos resultados na taxa de prenhez. Mesmo com os melhores protocolos de criopreservação, há uma redução de cerca de 50% no número de espermatozoides viáveis, como também na sua longevidade (SQUIRES et al., 1999), sendo essa condição um dos fatores limitantes da utilização dessa técnica em nível comercial.

A maioria das pesquisas nessa área tem sido direcionada para a busca de crioprotetores mais eficazes, que possam minimizar os danos espermáticos provocados pelo congelamento (CANDEIAS et al., 2012). No entanto, o uso de diferentes diluentes, crioprotetores e curvas de resfriamento e congelamento, não tem conseguido atingir os resultados esperados.

Nesse sentido, o presente estudo apresenta uma nova abordagem desse problema, buscando avaliar o efeito da inibição da enzima fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) sobre a motilidade e reação acrossômica de espermatozoides equinos, uma

vez que a criopreservação gera alterações na célula espermática que causam uma drástica queda dos parâmetros seminais pós-descongelamento e levam a perda de estruturas da membrana, principalmente de colesterol, o que resulta em reações acrossômicas precoces. Tal condição é responsável por diminuir a viabilidade do sêmen no trato reprodutor da égua, reduzindo a taxa de prenhez.

Estudos realizados em humanos demonstraram a influência da PI3K na regulação da motilidade espermática (DU PLESSIS et al., 2004; LUCONI et al., 2001, 2005; YANG et al., 2006). Essa quinase está envolvida em uma série de cascatas de sinalização que envolve a regulação de muitos processos celulares, incluindo a sobrevivência, o controle do metabolismo, a capacitação espermática, a reação acrossômica e a própria motilidade espermática. (ANDERSON et al., 1999; FISHER et al., 1998; KASTO et al., 2001).

A motilidade espermática é influenciada pela modulação da atividade da proteína quinase A (PKA), mediante alterações na concentração intracelular de cAMP, o qual é regulado pela atividade de adenilato ciclase e da fosfodiesterase (Holt & Harrison, 2002). Tem sido proposto que a via da PI3K atua de forma negativa sobre a motilidade espermática, regulando negativamente a síntese de cAMP e consequentemente da PKA, devido a inibição da adenilato ciclase. (APARICIO et al., 2005, DU PLESSIS et al., 2004; LUCONI et al., 2001, 2005; YANG et al., 2006).

NAUC et al. (2004) testaram a inibição da atividade da PI3K pelo tratamento dos espermatozoides humanos com o *wortmannin* (inibidor seletivo dessa enzima) obtendo como resultado uma melhora na motilidade espermática (LUCONI et al., 2001) e prevenção da reação acrossômica precoce (FISHER et al., 1998). Isso sugere que a inibição da PI3K pode ter efeito importante no processo de congelamento do sêmen equino, uma vez que ao melhorar a motilidade seminal pós-congelamento e ao prevenir a reação acrossômica precoce, poderá aumentar a permanência do espermatozoide equino no trato reprodutor feminino da égua e alcançar melhores resultados com o uso do sêmen congelado equino.

2- OBJETIVOS

2.1-GERAL

- Verificar o efeito da inibição da atividade da enzima PI3K sobre a preservação do sêmen equino da raça Mangalarga Marchador.

2.2- ESPECÍFICOS

- 1- Determinar o efeito das concentrações do inibidor wortmannin sobre a motilidade de espermatozoides equinos no semen fresco, resfriado e congelado;
- 2- Avaliar o efeito da inibição da PI3K sobre os parâmetros seminais [motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) e porcentagem de espermatozoides com movimentos rápidos (EMR)];
- 3- Verificar o efeito da inibição da PI3K sobre a atividade mitocondrial, viabilidade espermática e reação acrossômica de espermatozoides equinos descongelados.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1-INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS

A inseminação artificial, biotecnologia da reprodução mais importante e mais utilizada para melhoramento genético animal, foi a primeira biotécnica a ser utilizada, revolucionando os sistemas de produção animal (ARRUDA, 2000).

Essa tecnologia tem como vantagens grande aplicação por necessitar de poucos machos selecionados para a produção de espermatozoides para a inseminação de centenas de fêmeas por ano, por diminuir a transmissão de patógenos via coito, por exigir menos do garanhão e por facilitar a reprodução pela facilidade de transporte do sêmen para diferentes regiões do país, sem a necessidade de transportar a égua e possibilitando melhor aproveitamento de garanhões geneticamente superiores. Como desvantagens, pode-se citar a grande variabilidade e imprevisibilidade na tolerância a diferentes diluidores, refrigeração e resposta individual entre garanhões.

Por muitas décadas, a utilização da IA na espécie equina sofreu imposições por muitas associações de criadores que não permitiam a utilização da técnica (SAMPER; ESTRADA; MCKINNON, 2007). Poucos anos atrás, as legislações em diversos países do mundo se tornaram mais flexíveis, permitindo o registro de potros oriundos dessa biotecnologia. Essa decisão gerou um grande impacto nas pesquisas e no desenvolvimento de produtos voltados à tecnologia do sêmen equino em todo o mundo, principalmente nos Estados Unidos (LOOMIS, 2006), na Europa (AURICH; AURICH, 2006) e no Brasil (PAPA et al., 2005).

Porém, ainda hoje muitas questões permanecem para que se possa utilizar essa ferramenta com eficiência na espécie equina. A viabilidade dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea varia de acordo com o tipo de sêmen utilizado (fresco, resfriado ou congelado). Isto é o que determina o momento mais adequado para a inseminação. Uma vez dentro do útero, os espermatozoides migram a tuba uterina onde se ligam à sua mucosa, permanecendo armazenados como em um reservatório, e então gradualmente eles são liberados do epitélio para o lúmen desse órgão (BOCHIO, 2012; DAELS, 2003). O uso da inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado tem difundido entre os haras, a obtenção de

boas taxas de prenhez depende, além da frequência e momento da inseminação artificial (IA), principalmente de fatores relacionados com a refrigeração do sêmen, como o equipamento utilizado para transporte, curva de refrigeração, temperatura final de estocagem, tempo de preservação, taxa de diluição, concentração e volume da dose inseminante, e a variação individual entre garanhões (BRINSKO, 2006;NUNES et al., 2006).

O sêmen refrigerado deve ser utilizado preferencialmente dentro de 24 horas após seu processamento, para evitar uma redução na taxa de fertilização. Por isso, caso a ovulação não ocorra até 24 horas após a inseminação artificial (IA), deve-se realizar uma nova coleta e inseminação (PAPA et al.,2007).

Apesar do desenvolvimento de novos diluentes e de técnicas de seleção espermática, ainda não se conseguiu prolongar o tempo de armazenamento por mais de 24-48 horas sem comprometer sua fertilidade, fazendo-se necessárias pesquisas para se descobrir aditivos, que incorporados no meio diluidor, consigam contornar esse problema, maximizando ainda mais o uso do sêmen resfriado.

Em equinos, o resfriamento de sêmen tem sido bastante utilizado, visto que o congelamento traz grandes alterações celulares, reduzindo substancialmente a capacidade fertilizante dos espermatozoides. Tais alterações fazem com que os espermatozoides não consigam se ligar à parede da tuba uterina, perdendo a capacidade de permanecerem no interior desse órgão, o que limita a viabilidade seminal no trato reprodutivo da égua em aproximadamente 12 horas, por isso a importância da IA ser realizada próxima à ovulação. Pode-se realizar a IA com sêmen congelado até 6 horas após a ovulação, tempo da viabilidade do óvulo depois da ovulação (DAELS, 2003; PAPA et al.,2007).

Dessa forma, existe a necessidade da aplicação de medidas para a obtenção de melhores índices de fertilidade. Alguns autores têm desenvolvido técnicas como a deposição do sêmen na extremidade do corno uterino e a inseminação histeroscópica, na qual faz-se a deposição do sêmen na junção útero tubárica com auxílio de um endoscópio (LEÃO, 2002). Outra alternativa usada para tentar maximizar o uso do sêmen congelado tem sido direcionada para a busca de crioprotetores mais eficazes, que possam minimizar os danos espermáticos provocados pelo congelamento (CANDEIAS, 2010). No entanto, o uso de diferentes diluentes, crioprotetores e aditivos adicionados ao meio diluidor não tem conseguido atingir os resultados esperados.

Como uma alternativa inovadora para tentar buscar sanar esta problemática, estudos têm mostrado que a inibição da atividade da PI3K com o *wortmannin* (inibidor seletivo desta enzima) vem obtendo como resultado uma melhora na motilidade espermática e prevenção da reação acrossômica precoce em espermatozoides humanos (FISHER et al., 1998; LUCONI et al., 2001). Isso sugere que a inibição da PI3K pode ter efeito importante no processo de congelamento do sêmen equino, uma vez que ao melhorar a motilidade seminal pós-congelamento e ao prevenir a reação acrossômica precoce, poderá aumentar o tempo do espermatozoide equino no trato reprodutor feminino, e assim alcançar melhores resultados com o uso da inseminação artificial com o sêmen equino congelado.

3.2-CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO

Por volta do ano de 1700, Spallanzani acondicionou sêmen de cavalo e cão na neve e observou diminuição da motilidade dos espermatozoides e posterior motilidade após o aquecimento (HOPKINS & MEDOWS, 2003). O primeiro relato de sucesso na criopreservação de sêmen em animais foi na década de 40, com sêmen bovino (PHILLIPS & LARDY, 1940). Todavia, desde então, a utilização de técnicas de criopreservação tem sido estudada em diversas espécies domésticas, tendo em vista as diferenças na morfologia e composição da célula espermática entre as diferentes espécies (CHIRINEA et al., 2013; CANDEIAS, 2010; FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009).

O congelamento trouxe vários benefícios ao sistema de produção de equinos, facilitando o armazenamento de sêmen por período indeterminado e a comercialização deste material genético, controlando doenças sexualmente transmissíveis, propiciando que a colheita do sêmen seja realizada durante todo o ano, mesmo fora da estação de monta, principalmente, acelerando o ganho genético, sendo a melhor forma de seguro biológico de garanhões (ALVARENGA et al., 2000).

Apesar dos esforços para melhorar as técnicas de congelamento do sêmen equino, a perda da viabilidade espermática pós-descongelamento ainda é um fator limitante para o uso disseminado dessa técnica. A perda da integridade da membrana observada nas células espermáticas após o descongelamento, diminui a

sobrevivência e a capacidade fecundante dos espermatozoides (HENRY et al, 2002).

O processo de criopreservação de sêmen envolve os seguintes passos: queda de temperatura de forma lenta e gradual, desidratação celular, e congelamento e descongelamento (MEDEIROS et al., 2002). Esse processo pode causar lesões celulares devido ao choque térmico, à formação de cristais de gelo intracelulares, às injúrias oxidativas, ao estresse osmótico e às alterações no DNA (BALL et al., 2001).

Uma das questões relacionadas com a eficiência das técnicas de criopreservação é a velocidade de redução da temperatura durante o congelamento. Essa tem sido uma das etapas mais importantes no processo de criopreservação, visto que o grau de lesões celulares depende da curva de resfriamento (WATSON, 1995).

Inicialmente o sêmen deve ser resfriado da temperatura corpórea (37°C) à temperatura ambiente (20°C), o que parece não causar danos às células quando estas estiverem diluídas em meio adequado (KEITH, 1998). Porém, o estresse inicial ocorre quando os espermatozoides passam da temperatura ambiente para 5°C (SQUIRES et al, 1999). Isto se deve à fase de transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino para a fase de gel (GRAHAM, 1996). Esse estresse leva a alterações caracterizadas por um movimento alterado, rápida queda de motilidade espermática, lesões nas membranas celulares, redução do metabolismo, perda de enzimas e outros componentes intracelulares, o que é conhecido como choque térmico (AURICH, 2005).

Durante o processo de congelamento as células são expostas a duas faixas críticas de temperatura (+ 19°C a + 8°C e -15°C a - 60°C), onde a possibilidade de formação de grandes cristais de gelo aumenta, e pelas quais os espermatozoides devem passar duas vezes, durante o congelamento e o descongelamento (MAZUR 1984).

Para que os efeitos do choque térmico sejam minimizados é necessário controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19°C e 8°C, e adicionar lipídios e lipoproteínas ao diluente (GRAHAM, 1996), além do uso de curvas de resfriamento lentas. Caso a curva de resfriamento seja feita de forma inadequada, os espermatozoides sofrerão alterações nos padrões normais de motilidade, danos em seu metabolismo, na membrana plasmática e no acrossoma (SQUIRES et al.,

1999).

As membranas espermáticas são as estruturas mais afetadas pelo choque térmico (AMANN e GRAHAN, 1993), que leva a danos estruturais diretos como a sua ruptura, ou indiretos, por alterações das funções celulares (SQUIRES et al., 1999).

O choque térmico é sentido de forma diferente em cada espermatozoide de cada animal, dependendo do grau de maturação do espermatozoide, da espécie do animal, da variação individual, da quantidade de plasma seminal, dentre outros fatores (WATSON, 1981).

Com o declínio constante da temperatura, as células estarão expostas à temperatura de congelamento (abaixo de 0°C), e com isto, as células espermáticas serão submetidas a alterações. Entre - 5 °C e - 10°C, começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular, que permanece super-resfriado (não cristalizado). Ocorre nessa temperatura troca de água para manter o equilíbrio osmótico entre o meio extra e o intracelular, ocasionando a desidratação das células. Neste ponto, a curva de congelamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. Uma desidratação severa promove a desnaturação das macromoléculas e o encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana. O uso de curvas de congelamento adequadas pode minimizar estes danos (HOLT, 2000; WATSON, 1995).

A faixa crítica de danos durante o congelamento ocorre entre -15°C e -60°C. Após o sêmen atravessar esta faixa de temperatura, a atividade metabólica cessa e as células permanecem inativas (GRAHAN et al., 1996).

O processo de congelamento modifica a membrana celular de modo que altera a habilidade do gameta masculino de interagir com as estruturas do trato reprodutivo feminino. De acordo com BAILEY et al. (2000), os espermatozoides congelados possuem menor capacidade de aderir às células epiteliais do oviduto. Este local atua como reservatório para manutenção dos espermatozoides em metabolismo basal, proporcionando assim, viabilidade às células até o momento da ovulação. Adicionalmente, o congelamento promove perdas de aproximadamente 28% do conteúdo de colesterol da membrana espermática (MOORE et al, 2005). Tal fato contribui para a ocorrência de reações acrossômicas prematuras e consequentemente, diminuição da viabilidade pós-descongelamento dos

espermatozoides equinos.

Com o objetivo de evitar esse quadro, pesquisas têm sido direcionadas para a busca de crioprotetores e aditivos mais eficazes, que possam minimizar os danos espermáticos provocados pelo congelamento (HARTWIG et al., 2012; CANDEIAS, 2012; NAUC, 2004).

O descongelamento consiste na inversão das mudanças ocasionadas pelos processos de refrigeração e congelamento, sendo observados, durante esta etapa, o decréscimo na concentração intracelular de soluto e a restauração da concentração da solução intracelular e do volume celular (HOLT et al., 1992). Apesar de o descongelamento estar ligado ao restabelecimento das características celulares, esta pode ocasionar peroxidação lipídica e danos à membrana, decorrentes do rápido aumento da utilização de oxigênio pelo espermatozoide (GUERRA et al., 2004), assim como a ruptura da membrana em razão do excessivo fluxo de água para o interior da célula (HOLT, 2000). Deste modo, é indispensável que a técnica de descongelamento seja determinada de acordo com o método de congelamento utilizado (PURDY, 2006a).

As temperaturas de aquecimento dependem diretamente da velocidade da curva de congelamento. Se o congelamento foi lento, o descongelamento também deverá ser lento para permitir a fusão dos cristais de gelo extracelulares. O descongelamento destes cristais provoca diluição dos solutos e lentamente ocorre a reidratação das células. Se o sêmen for descongelado rapidamente os cristais extracelulares descongelam-se muito rapidamente e a água invade bruscamente as células, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática (HOLT, 2000).

Com o intuito de minimizar essas alterações provocadas pela ação das baixas temperaturas, as células são colocadas em meios diluidores que, em geral, são compostos por carboidratos, como fonte de energia; tampões para manutenção do pH e da pressão osmótica; antibióticos; crioprotetores não penetrantes e crioprotetores penetrantes (HAFEZ & HAFEZ, 2004; PURDY, 2006a).

Segundo ARRUDA (2000), os crioprotetores devem ser adicionados ao meio para que haja uma proteção dos espermatozoides durante o congelamento e também durante o descongelamento. Estes são componentes essenciais de um meio diluidor de congelamento e são classificados como intracelulares ou extracelulares, dependendo da sua capacidade de atravessar a membrana plasmática. Os crioprotetores penetrantes passam através da membrana

espermática e atuam tanto intracelularmente quanto extracelularmente, como é o caso do glicerol e da dimetilformamida, entre outros, que se comportam como solventes e possuem o ponto de congelamento muito mais baixo do que o da água. Já os não penetrantes, por sua vez, não têm a capacidade de atravessar a membrana plasmática devido ao seu maior tamanho molecular e estrutura química, sendo eles: proteínas do leite e do ovo, açúcares, polímeros sintéticos e amidas. Estes atuam unicamente em nível extracelular (GRAHAM, 1995).

Uma alternativa para melhorar a qualidade do sêmen são os aditivos, entre eles os aditivos hormonais, enzimáticos, antioxidantes, ativadores da motilidade espermática, entre outros, que ao serem incorporados ao meio diluidor têm o objetivo de minimizar os danos sofridos pelos espermatozoides ou melhorar a função espermática durante o processo de resfriamento, congelamento e descongelamento.

Tem sido demonstrado que em espermatozoides humanos o uso da inibição da atividade da PI3K, com o inibidor *wortmannin*, promoveu uma melhora na motilidade espermática e prevenção da reação acrossômica precoce, sendo uma possível alternativa para ser utilizada como um aditivo ao sêmen e possibilitar melhores resultados na criopreservação (FISHER et al., 1998; LUCONI et al., 2001; NAUC et al., 2004).

3.3-A ENZIMA FOSFATIDILINOSITOL-3-QUINASE (PI3K)

Tem sido descrita a presença da enzima PI3K em espermatozoides de humanos, hamster, suíno, bovino, ovino, corvina do atlântico e aves (APARICIO et al., 2005; ASHIZAWA et al., 2008; BREITBART et al., 2014; KOPPERS et al., 2011; LUCONNI et al., 2001, 2005, 2006; NAGDAS et al., 2002; PATIL et al., 2013; TAN et al., 2014). Em equinos, este é o primeiro trabalho a ser realizado avaliando a regulação da atividade da PI3K sobre os parâmetros físicos do sêmen in natura, refrigerado e congelado.

A PI3K faz parte do grupo das quinases intracelulares que fosforilam o grupo três hidroxila de fosfatidilinositol e fosfoinosítídeos, levando a conversão de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3)

(LUCONI et al., 2004). Isto proporciona sítios de interação para associações de várias proteínas, envolvidas na transdução de sinal nas células (BREITBART et al., 2010).

As PI3K são classificadas em classes I, II e III, sendo a classe I composta pelas subclasses A e B. A PI3K da classe IA é heterodimérica, com uma subunidade regulatória (p85) e outra catalítica (p110), onde a subunidade regulatória mantém a subunidade catalítica em repouso e medeia sua ativação pela interação com resíduos de fosfotirosina (Figura 1). Sendo assim, a PI3K estimulada, converte PIP2 em PIP3 (CANTLEY, 2002; ORCY et al., 2008; BREITBART et al., 2010).

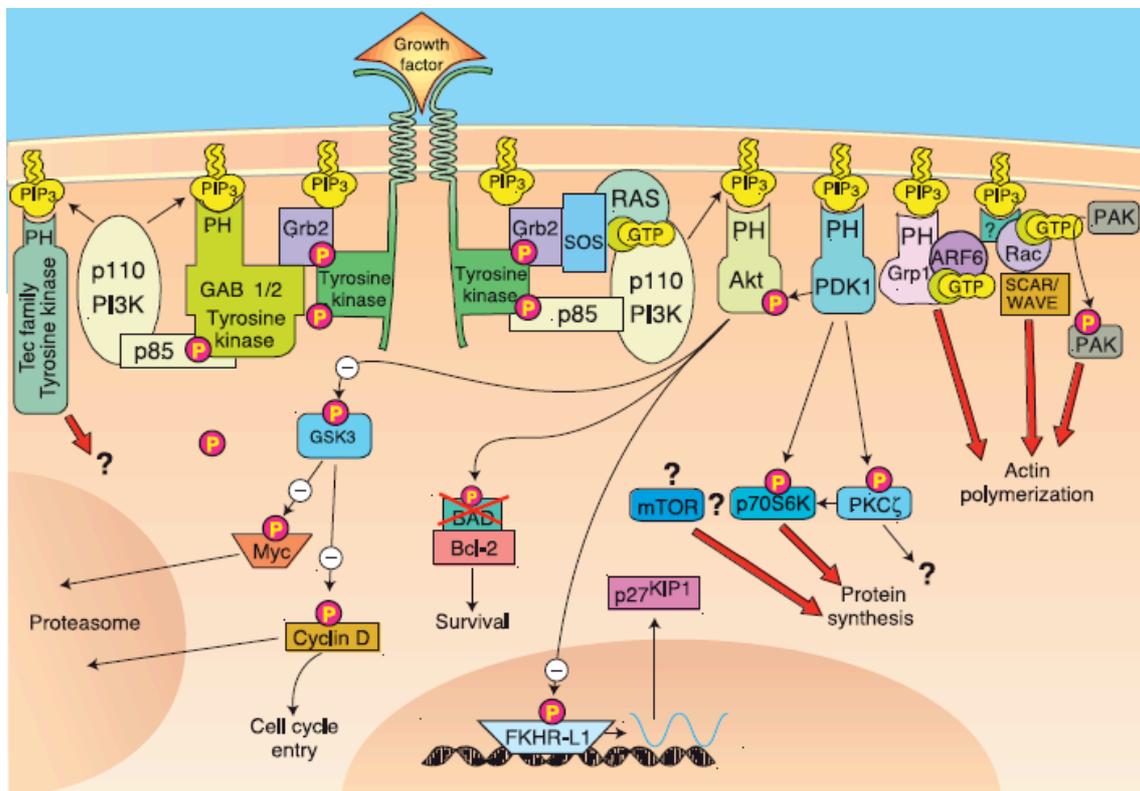


Figura 1. Via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) pode afetar o crescimento, a sobrevivência e a movimentação celular. A ativação dos receptores resulta na fosforilação dos resíduos de tirosina, ativando a PI3K. Adaptado de Cantley (2002).

Tem sido sugerido que a enzima PI3K está envolvida em uma série de cascatas de sinalização que envolve a regulação de muitos processos incluindo a sobrevivência celular, o controle do metabolismo, a capacitação espermática, a

reação acrossômica e a própria motilidade espermática (ANDERSON et al., 1999; FISHER et al., 1998; KASTO et al., 2001).

3.3.1-PI3K na motilidade seminal

A motilidade é uma das funções mais peculiares do gameta masculino maduro. O conhecimento das vias de transdução de sinais que regulam a motilidade espermática é de suma importância para obter uma visão de novos métodos para aumentar a capacidade de fertilização das amostras de sêmen, especialmente aquelas submetidas a biotecnologias da reprodução, tais como a criopreservação do sêmen equino (APARICIO, 2005). Em espermatozoides de mamíferos, a capacidade de se locomover ativamente, com base na estrutura especializada do flagelo, é adquirida durante o trânsito através do epidídimo sob o controle de diferentes fatores, tais como AMP cíclico, pH intracelular, cálcio intracelular e fosforilação de proteínas do espermatozoide (LECLERC et al., 1996; VIJAYARAGHAVAN et al., 1997a). Estes fatores também estão envolvidos no desenvolvimento de um tipo específico de motilidade, chamado hiperativação, que ocorre como uma consequência da ativação do espermatozoide no trato genital feminino, ou por incubação *in vitro* em vários meios (HO & SUAREZ, 2001). A fosforilação de proteínas do espermatozoide é regulada por um equilíbrio complexo entre quinases e fosfatases, que desempenham um papel crucial no desenvolvimento e na manutenção da motilidade (VIJAYARAGHAVAN et al., 1997a; TASH & BRACHO, 1994).

Em particular, a via AMPc / PKA-dependente (Figura 2) está envolvida na fosforilação da tirosina de diferentes proteínas do flagelo do espermatozoide, associada a um aumento na motilidade do gameta (PATIL et al., 2002; LECLERC & GOUPIL, 2002; FICARRO et al., 2003). O AMPc produzido por ativação da adenilato ciclase liga-se a PKA resultando na ativação da subunidade catalítica dessa enzima.

Entre as enzimas envolvidas na regulação da motilidade dos espermatozoides, a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) foi sugerida por desempenhar um papel importante, uma vez que a sua inibição farmacológica levou a um aumento significativo dos níveis intracelulares de AMPc, do recrutamento da PKA no flagelo

(LUCCONI et al., 2004) e da motilidade em espermatozoides humanos (LUCONI et al., 2001).



Figura 2. Esquema demonstrando a via de sinalização da PI3K sobre a motilidade seminal. A atividade da PKA é dependente da concentração de AMP cíclico, que por sua vez é regulada pela adenilato ciclase. A PI3K atua de forma negativa sobre a motilidade espermática, regulando negativamente a síntese de cAMP e consequentemente da PKA, devido à inibição da adenilciclase.

3.3.2-PI3K na capacitação espermática

Os espermatozoides de mamíferos não possuem a habilidade para fecundar os ovócitos imediatamente após a ejaculação, mesmo estando móveis e com aparente morfologia normal. No processo *in vivo*, os espermatozoides alcançam esta capacidade fecundante no trato genital feminino. A capacidade de adquirir competência fecundante, através de modificações funcionais e estruturais, foi denominada de capacitação espermática (ASSUMPÇÃO et al., 2002).

A capacitação espermática envolve a ocorrência de diversos eventos

moleculares, tais como a remoção de colesterol da membrana plasmática e o fluxo de íons na membrana plasmática. Estes eventos provocam alterações no potencial de membrana e aumento da fosforilação de proteínas envolvidas na indução da hiperativação e na reação acrossômica do espermatozoide (VISCANTI et al., 2002; HAFEZ, 2004).

A capacitação é mediada pelo influxo dos íons bicarbonato (HCO_3^-) e cálcio (Ca^{2+}). O movimento transmembranar dos ânions de bicarbonato é mediado por membros da família dos co-transportadores da $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, enquanto o Ca^{2+} é mediado por diversos canais de cálcio. O influxo desses íons é responsável pelo aumento do pH intracelular além da ativação da AC (VISCANTI et al., 2011), o que leva ao aumento da síntese de AMPc. O aumento da concentração desse nucleotídeo, ativa a PKA, a qual está envolvida com a indução da hipermotilidade (VISCANTI et al., 2002; SALICIONI et al., 2007; ABOU-HAILA et al., 2009) (Figura 3).

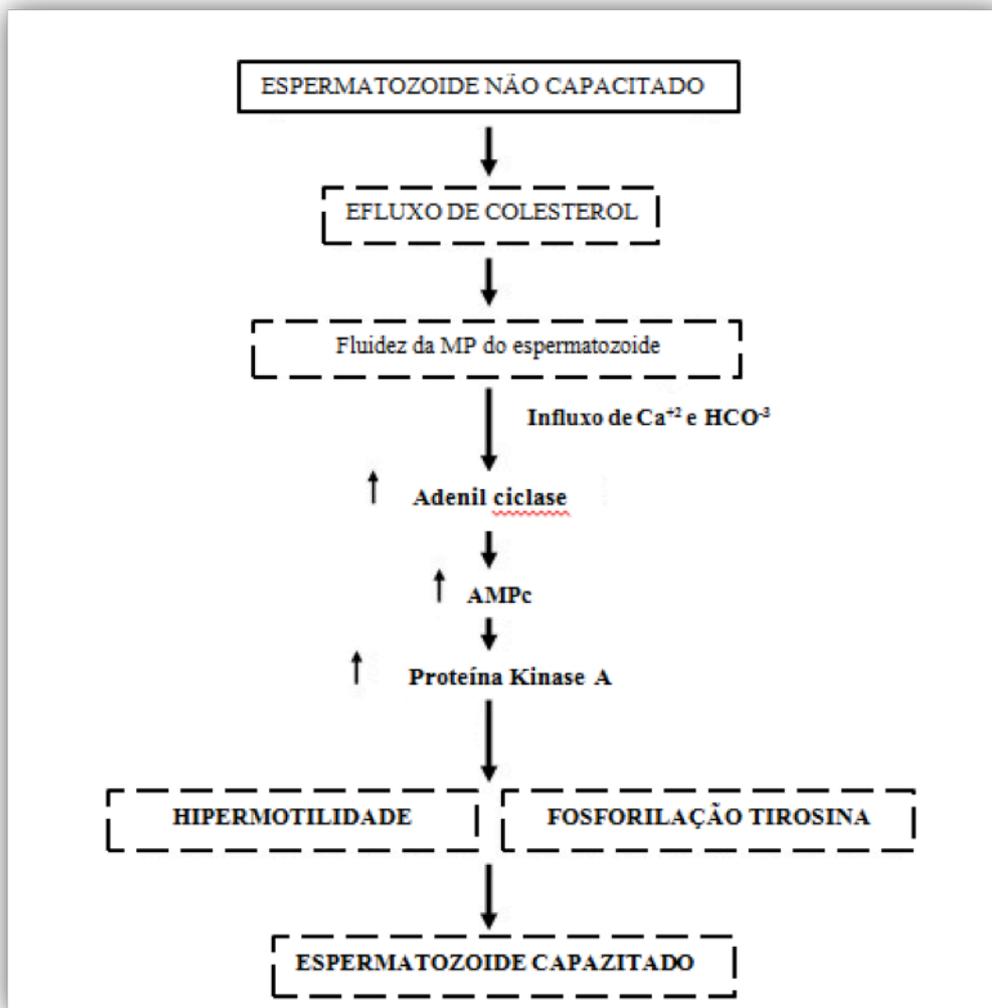


Figura 3. Eventos envolvidos na capacitação espermática. Fonte: adaptado de Breitbart et al. (2010).

Ainda não está bem estabelecido se a PI3K está envolvida na capacitação espermática, no entanto um aumento da produção de PIP3 ocorre durante esse evento indicando que a enzima é pelo menos parcialmente ativa durante este período de tempo (ETKOVITZ et al., 2007).

Há algumas evidências da participação da PI3K na reação acrossômica, pois a enzima é altamente fosforilada / ativada no período final da capacitação antes do início da reação acrossômica (Figura 4). Em espermatozoides de rato, a PI3K também é ativada quando estes são incubados em condições in vitro de capacitação (COTTON et al., 2006). Segundo Breitbart et al. (2010), a PI3K é ativada pela PKA e a sua atividade é suprimida pela PKC, provavelmente pela sua isoforma α . Foi

também demonstrado que a PKC α pode inibir a PI3K diretamente ou indiretamente (SPEIKI et al., 2006; GUAN et al., 2007). BREITBART et al., (2010) hipotetizaram que a relação entre a atividade da PKA e a atividade da PKC α dita a ativação da PI3K. A ativação da PKA no espermatozoide, pode levar a inativação da PKC α , provavelmente pela inativação da fosfolipase C pela PKA (COHEN et al., 2004). Além disso, embora a PKA seja ativada em um momento muito inicial do processo de capacitação (HARRISON, 2004), a fosforilação da PI3K não é distinguível ainda, possivelmente devido à elevada atividade da PKC α , enquanto que no final da capacitação, a PKC sofre desfosforilação e degradação significativa, sugerindo que a ativação de PKA e a supressão da PKC α permitem a ativação PI3K (Figura 4).

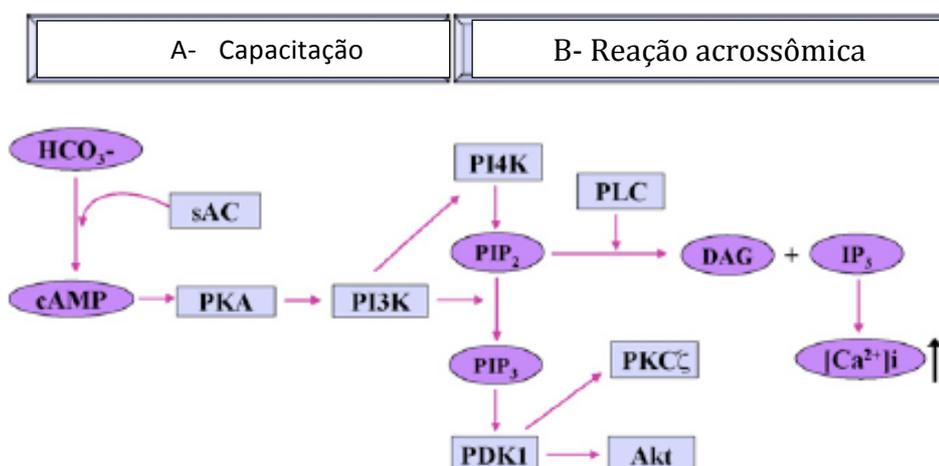


Figura 4. Modelo da regulação da atividade da PI3K na capacitação espermática e reação acrossômica. **Capacitação:** efluxo de colesterol da membrana plasmática do espermatozoide aumenta a permeabilidade do bicarbonato na célula, resultando na ativação da adenilato-ciclase solúvel (SAC), que leva à produção de cAMP e ativação da PKA, a qual ativa a PI3K. **Reação Acrossômica:** a PI3K ativada fosforila PIP₂ para produzir PIP₃, que ativa PDK1 levando a ativação de Akt e da PKC α , resultando na ocorrência da reação acrossômica, como sugerido por Jungnickel et al. (2007).

3.3.3-PI3K na reação acrossômica

Em sequência à capacitação espermática é necessário que os espermatozoides passem por uma mudança fisiológica, chamada reação acrossômica, que os tornará aptos a fecundação do ovócito (MOORE, 2004).

A reação acrossômica compreende a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa, o que faz com que o conteúdo acrossomal seja liberado ou exposto através de orifícios criados pela fusão das membranas. Dentre os componentes da célula espermática liberados pela reação acrossômica está a hialuronidase que tem a função de dispersar as células do *cumulus* que envolvem o óvulo. Outra enzima liberada é a proacrosina que abre o caminho através da zona pelúcida, permitindo assim a fertilização (HAFEZ, 2004).

A reação acrossômica, no entanto, só irá ocorrer após a ligação do espermatozoide com a zona pelúcida, sendo parcialmente induzida por um componente glicoproteico da zona pelúcida (YANAGUIMACHI, 1994). A zona pelúcida é composta de três glicoproteínas em que a glicoproteína ZP3 desencadeia a reação acrossômica (BLEIL & WASSARMAN, 1983). Esta proteína liga-se a dois receptores na membrana plasmática do espermatozoide: receptores acoplados a proteínas G inibitórias (receptores Gi) e receptores de tirosina quinase (REID et al, 2011; WITTLE et al., 2007). A ligação da ZP3 aos receptores Gi ativa a PLC, neste caso a isoforma PLC1, e regula a atividade da sAC para a produção de cAMP e, assim, ativa a PKA. Por outro lado, a ligação da proteína aos receptores de tirosina quinase leva à ativação da PLC1. A ativação de ambas as fosfolipases leva à formação de Inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e de diacilglicerol (DAG). O IP3 bem como a PKA, ativam os canais de Ca^{2+} presentes na membrana acrossomal externa, promovendo a transferência de Ca^{2+} das reservas intracelulares para o citoplasma (BREITBART, 2002). Por sua vez, o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) levando à abertura dos canais de Ca^{2+} na membrana plasmática do espermatozoide (SPUNGIN et al., 1996).

Tem sido sugerido que a ligação de proteínas da membrana espermática com a glicoproteína ZP3 leva ao acúmulo de PIP3 na membrana do espermatozoide, produto da atividade da PI3K, resultando na ativação da Akt e PKC, dois componentes essenciais para que ocorra a reação acrossômica. A atividade da PI3K provavelmente é regulada durante a capacitação espermática, tornando-se ativa no final desse processo para desencadear a reação acrossômica (JUNGNICKEL et al., 2007).

A PI3K desempenha um papel importante na regulação da exocitose acrossomal em espermatozoides de ratos e de humanos. A utilização de inibidores da PI3K reduziu em até 30% as taxas de reação acrossômica (AR) (FISHER et al.,

1998; FENG et al., 1998; BREITBART et al., 2010). Essa informação se torna importante uma vez que a criopreservação gera alterações nos espermatozoides que causam uma drástica queda dos parâmetros seminais pós-congelamento e leva a perdas de estruturas da membrana, principalmente de colesterol, o que resulta em reações acrossômicas precoces que são responsáveis por diminuir a viabilidade do sêmen equino no trato reprodutor da égua, reduzindo a taxa de prenhez. Dessa forma, o uso do inibidor da PI3K pode desempenhar um papel importante para evitar esses danos durante o processo de criopreservação.

3.4- O wortmannin e a inibição da PI3K

O *wortmannin*, um inibidor específico da PI3K, é um metabólito fúngico descoberto em 1987. A sua utilização possibilita a convergência entre dois importantes sistemas de sinalização celular: o de receptor de proteína G e os de receptores de proteína quinase (UI et al., 1995).

Em concentrações nanomolares, o *wortmannin*, é considerado um inibidor potente, seletivo da PI3K, e tem sido usado amplamente para demonstrar o papel da PI3K em diversos processos de transdução de sinal. O inibidor é permeável a membrana plasmática apresentando uma dose de inibição de 1,8 a 4,0 nM, tendo sido considerado potente em inibir e não apresentar efeitos em outras moléculas envolvidas com a sinalização, como por exemplo a proteína quinase C (PKC), a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina e AMP cíclico (AMPC) (WYMANN et al., 1996).

Embora ainda não seja completamente compreendido como a inativação da PI3K possa afetar as respostas celulares subsequentes, sabe-se que as atividades enzimáticas são afetadas pela presença de inibidores (WYMANN et al., 1996).

4-METODOLOGIA

4.1- ANIMAIS E LOCAL DOS EXPERIMENTOS

Foram utilizados cinco garanhões adultos da raça Mangalarga Marchador, clinicamente sadios, com idades variando entre 3 e 10 anos, com histórico reprodutivo de fertilidade comprovada, localizados em haras sediado em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

Esses animais foram mantidos estabelecidos, onde receberam ração comercial duas vezes ao dia e água a vontade.

O processamento do sêmen para sua avaliação e criopreservação foi realizado no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense, no Setor de Biotecnologia do Sêmen.

4.2- DESENHO DO ESTUDO

Para cada experimento foram utilizados cinco ejaculados, sendo um de cada garanhão. O sêmen coletado foi diluído em BotuSêmen[®] (Botupharma), 1:1 (v:v) e mantido em caixa térmica a 37° C para ser transportado do haras até o laboratório, em um trajeto que durou 20 minutos. Então as amostras foram avaliadas e selecionadas segundo os critérios do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Experimento 1 – Avaliação da regulação da atividade da PI3K sobre parâmetros físicos do sêmen *in natura*

Neste experimento as amostras de sêmen foram aliqüotadas em volumes 1,5 mL, colocadas em tubos de microcentrífuga e mantidas em banho-maria a 37°C, suplementadas com 0, 5, 10, 30, 50 e 100 nM do *wortmannin* (inibidor da PI3K). Foram avaliados os parâmetros motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e porcentagem de espermatozoides com movimentos rápidos (EMR), com auxílio do

programa Ceros (Hamilton Torn Research). As avaliações foram realizadas a cada 30 minutos, até completar 2h.

Experimento 2 - Avaliação da regulação da atividade da PI3K sobre parâmetros físicos do sêmen resfriado ou congelado

De cada ejaculado foram preparadas 24 alíquotas de 1,5 mL. As amostras foram suplementadas com 0, 5, 10, 30, 50 e 100 nM do *wortmannin*. Para as avaliações do efeito da regulação da PI3K sobre o resfriamento do sêmen, foram utilizadas três alíquotas de cada tratamento. As amostras foram avaliadas a cada 24 horas durante um período de 72 horas. Em cada tempo foram analisadas a motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e porcentagem de espermatozoides com movimentos rápidos (EMR).

Para as avaliações com sêmen congelado foi utilizada uma alíquota de cada tratamento. As amostras foram submetidas ao congelamento e após o descongelamento foi realizada a avaliação dos parâmetros físicos (MT, MP, EMR), da atividade mitocondrial, da funcionalidade da membrana plasmática (teste hiposmótico) e da integridade das membranas plasmática e acrossomal.

4.3- OBTENÇÃO DO SÊMEN

As coletas foram realizadas durante a estação de monta 2015 / 2016. Inicialmente foi realizado um esgotamento das reservas epididimárias dos animais através de cinco coletas diárias antes do período experimental. Após este período inicial, foram coletados por meio de vagina artificial modelo Botucatu e copos coletores com filtro modelo Colorado para a espécie equina. A temperatura da água no interior da vagina artificial foi de 40-42 °C, sendo utilizada uma égua em cio devidamente contida para a realização da coleta de sêmen. Após o sêmen ser coletado, a porção gelatinosa retida no filtro foi descartada e o volume do ejaculado foi determinado, utilizando-se um tubo graduado. Após a chegada do Haras ao Laboratório de

Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA), trajeto este que durou 20 minutos, as amostras foram mantidas a 37°C em banho-maria, protegido da luz, para avaliação inicial das características seminais.

4.4- AVALIAÇÕES FÍSICAS DO SÊMEN

Inicialmente foram avaliadas as características macro (cor, aspecto e odor) e microscópicas (concentração espermática, motilidade espermática e EMR).

As características microscópicas foram avaliadas com auxílio do Sistema de Análise Computadorizado (CEROS 10.8[®], Hamilton Thorne Research).

4.4.1- Volume

O volume do ejaculado foi determinado mediante a leitura direta no tubo coletor, graduado em mililitros.

4.4.2-Concentração Espermática

Para o cálculo da concentração espermática foi utilizada uma diluição de 1:20 (10µl do sêmen em 190µl de água).

A concentração espermática foi mensurada através da câmara de Neubauer. O sêmen diluído foi observado com auxílio de um microscópio óptico. Foram contados cinco quadrados (cantos e meio) na parte de cima da câmara e outros cinco da parte de baixo. O número total de espermatozoides contados nas duas câmaras foi somado e dividido por dois. O resultado final foi expresso em número de espermatozoides / mL.

4.4.3- Motilidade dos espermatozoides

A motilidade espermática foi avaliada pelo sistema de análise computadorizado da Hamilton Thorn Research modelo Ceros 10.8 usando um programa específico para análise do sêmen de equino. Cada amostra foi colocada em uma lâmina pré-aquecida pela placa de platina aquecedora que mantém a temperatura a 37 °C e cinco campos foram analisados em microscópio ótico com aumento de 100x acoplado ao computador. Para a motilidade espermática foram analisados os parâmetros de motilidade total (MT,%), progressiva (MP,%), porcentagem de espermatozoides com movimentos rápidos (EMR).

4.5- RESFRIAMENTO

As amostras diluídas (1:1) em BotuSêmen[®] (Botupharma) foram acondicionadas em tubos plásticos de microcentrífuga e submetidas a uma temperatura de 5°C, por 72 h, em um resfriador de sêmen da Minitub[®]. A cada 24 horas, alíquotas eram retiradas do resfriador e aquecidas em banho-maria a 37 °C, por três minutos, para realização das avaliações de MT, MP e EMR.

4.6- CONGELAMENTO DO SÊMEN

Imediatamente após as análises iniciais, o sêmen diluído (1:1) foi centrifugado a 600 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido com diluente de congelamento Botucrio[®](Botupharma) e posteriormente foi adicionado o *wortmannin*, conforme a concentração específica de cada tratamento. As amostras foram envasadas em palhetas convencionais de 0,5 mL, devidamente identificadas e lacradas com álcool polivinílico, contendo a concentração de 100 milhões de espermatozoides por mL, totalizando 24 palhetas por animal. Em seguida as palhetas foram mantidas em um resfriador, a 5 °C, durante 20 minutos. Decorrido o tempo, as amostras foram colocadas a 4 cm acima do nível do nitrogênio líquido em um período de 20 minutos e em seguida foram imersas no

mesmo e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido até as posteriores análises (PAPA, 2007).

4.7- DESCONGELAMENTO DO SÊMEN

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C, durante 30 segundos e em seguida o conteúdo foi colocado em tubos plásticos de microcentrifuga, mantidos a 37°C protegidos da luz e submetidos à análise computadorizada da motilidade.

4.8- TESTE HIPOSMÓTICO (HOST)

Para verificar a funcionalidade da membrana espermática foi utilizado o teste hiposmótico. Em um tubo de microcentrifuga foram colocados 950 µL de água destilada e 50 µL da amostra de sêmen. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C. Em seguida foi colocada uma amostra de 10 µL entre lâmina e lamínula e realizada a análise com auxílio de microscópio de contraste de fase, com aumento de 400x. Foram contadas 200 células, onde foram consideradas as células com membrana funcional aquelas que apresentaram a cauda dobrada ou enrolada. Espermatozoides com a cauda esticada foram considerados danificados (DELL`A QUA et al., 2002).

4.9 AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS COM USO DE SONDAS FLUORESCENTES

A avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, assim como a determinação da atividade mitocondrial foram feitas pela associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI), lectina de pisum sativum conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC) e JC-1, respectivamente. Uma amostra de 50µL de sêmen pós-descongelamento foi adicionada a 150 µL de meio TALP. Então uma alíquota de 150 µL desta solução foi colocada em um tubo de microcentrifuga e

adicionados 5,0 µL de PI, 5,0 µL de JC-1 e 10 µL de FITC-PSA. A amostra foi incubada por oito minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Os espermatozoides foram avaliados com auxílio de um microscópio óptico de epifluorescência (TE 300, Nikon), sob aumento de 1000x. De cada amostra foram avaliadas 200 células. Os espermatozoides foram classificados segundo proposto por Celeghini (2005) conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação dos espermatozoides em categorias de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, detectadas pelos marcadores fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1, respectivamente.

	CATEGORIA	SIGLA
1	Membrana plasmática intacta, Acrossoma intacto e Com função mitocondrial	PIAIC
2	Membrana plasmática intacta, Acrossoma intacto e Sem função mitocondrial	PIAIS
3	Membrana plasmática intacta, Acrossoma lesado e Com função mitocondrial	PIALC
4	Membrana plasmática intacta, Acrossoma lesado e Sem função mitocondrial	PIALS
5	Membrana plasmática lesada, Acrossoma intacto e Com função mitocondrial	PLAIC
6	Membrana plasmática lesada, Acrossoma intacto e Sem função mitocondrial	PLAIS
7	Membrana plasmática lesada, Acrossoma lesado e Com função mitocondrial	PLALC
8	Membrana plasmática lesada, Acrossoma lesado e Sem função mitocondrial	PLALS

Adaptado de Celeghini (2005).

5.0- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados das características estudadas foram transferidos primeiramente a um arquivo de dados do programa Excel (Microsoft®). A existência de efeito dos tratamentos foi testada pelo teste t de Student, sendo apresentadas as significâncias (valor de P). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o aplicativo Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1), adotando-se o nível de 5% de significância.

6- RESULTADOS

Experimento 1 - Avaliação da regulação da atividade da PI3K sobre parâmetros físicos do sêmen in natura:

O tratamento do sêmen in natura com 0, 5, 10, 30, 50 e 100nM de *wortmannin* não influenciou a motilidade total, a motilidade progressiva e o percentual de espermatozoides com movimentos rápidos, determinados ao final de 2 h a 37 °C de avaliação ($P > 0,05$), conforme apresentado na Figura 5.

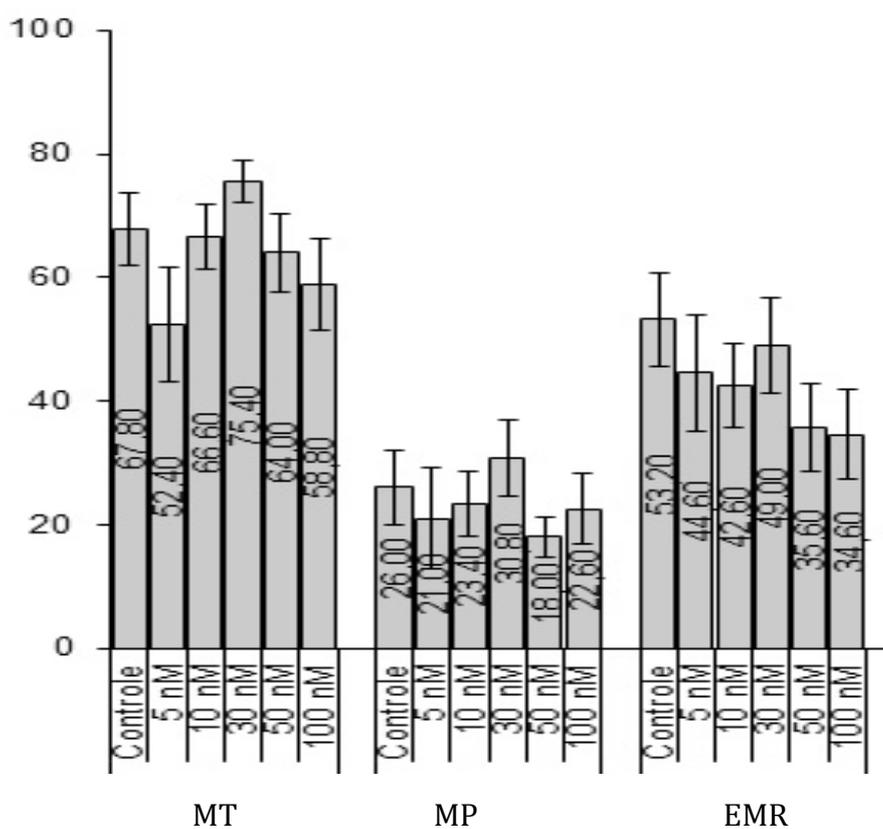


Figura 5. Percentual médio de motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides com movimentos rápidos de sêmen equino incubado por 120 minutos a 37 °C em diluente comercial suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100 nM de *wortmannin*. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de um total de cinco ejaculados, obtidos de cinco garanhões.

Experimento 2 - Avaliação da regulação da atividade da PI3K sobre parâmetros físicos do sêmen resfriado ou congelado

Sêmen refrigerado:

Visando verificar o efeito da regulação da atividade da PI3K de espermatozoides equinos pelo *wortmannin*, durante o armazenamento do sêmen sob condições de refrigeração, as amostras foram avaliadas às 24, 48 e 72 h de permanência a 5 °C.

Na avaliação às 24 h, o tratamento dos espermatozoides com 5 nM de *wortmannin* aumentou significativamente ($P < 0,05$) a motilidade total em relação aos tratamentos de 10 e 30 nM ($81.0 \pm 2,59$, $57.2 \pm 3,87$ e $55.8 \pm 4,5$ %, respectivamente). Porém, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre o controle e os demais tratamentos (Figura 6).

A motilidade progressiva (MP) e o percentual de espermatozoides com movimentos rápidos (EMR) também apresentaram uma diferença significativa entre as amostras tratadas com 5 e 30 nM de *wortmannin*, sem no entanto haver diferença entre espermatozoides do controle e dos demais tratamentos (Figura 6).

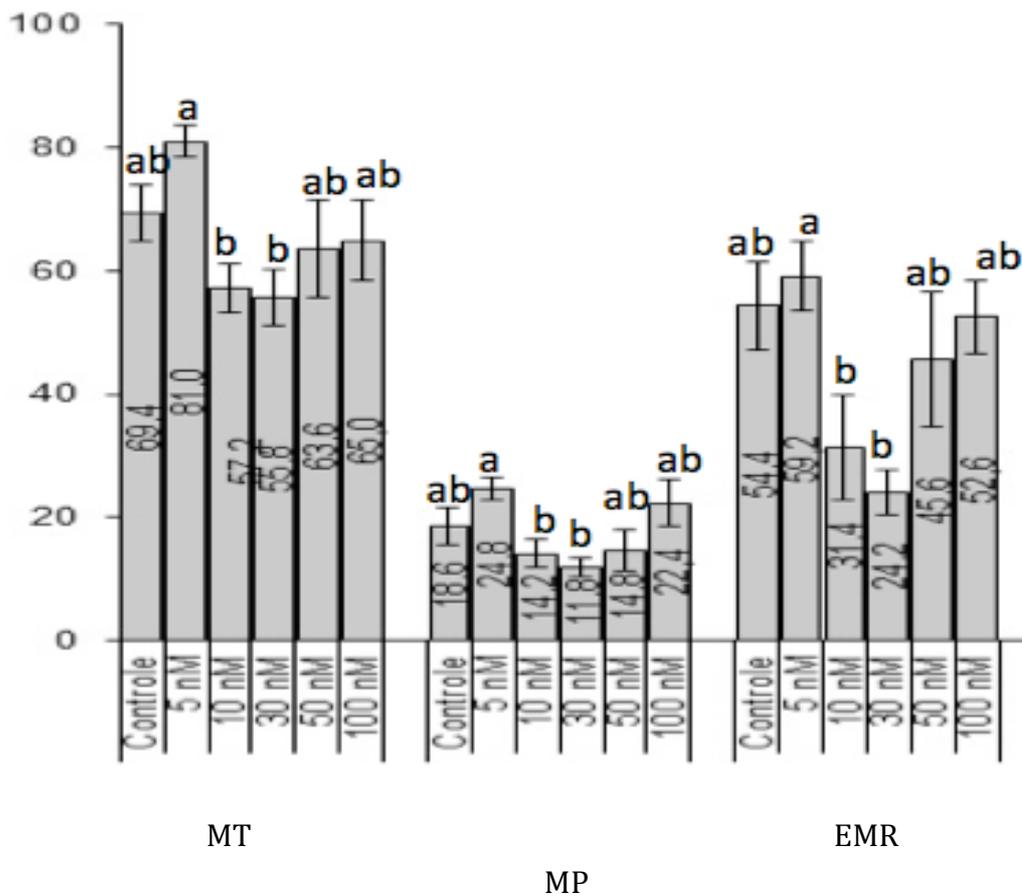


Figura 6. Percentual médio de motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides com movimentos rápidos de sêmen equino refrigerado com 24 h de avaliação, em diluente comercial suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100 nM de *wortmannin*. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de um total de cinco ejaculados, obtidos de cinco garanhões.

Às 48 h de resfriamento, o tratamento com 5 nM de *wortmannin* manteve elevada a motilidade total dos espermatozoides ($P < 0,05$) em relação aos tratados com 10 e 50 nM. Também nesse tempo, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre espermatozoides do controle e aqueles tratados com o *wortmannin* (Figura 7).

Nesse mesmo tempo de resfriamento, o percentual de motilidade progressiva e de espermatozoides com movimentos rápidos não foi influenciado pelos tratamentos ($P > 0,05$) (Figura 7).

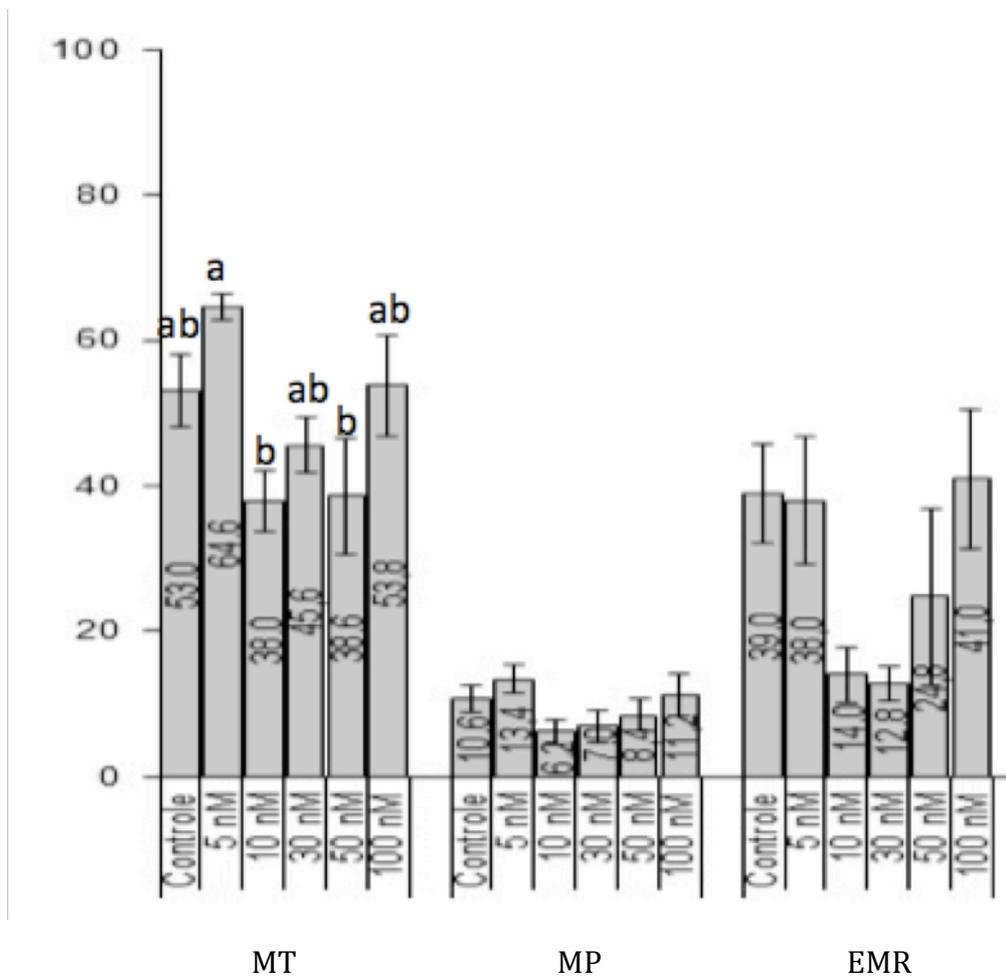


Figura 7. Percentual médio de motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides com movimentos rápidos de sêmen equino refrigerado com 48 h de avaliação, em diluente comercial suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100 nM de *wortmannin*. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de um total de cinco ejaculados, obtidos de cinco garanhões.

Na avaliação das 72 h observou-se novamente uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre o tratamento de 5 nM e o de 30 nM com relação a motilidade total. Da mesma forma como observado nas avaliações de 24 e 48 h, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os espermatozoides do controle e aqueles submetidos ao tratamento com o inibidor da PI3K (Figura 4). Também nesse tempo, os tratamentos não alteraram significativamente ($P > 0,05$) o percentual de motilidade progressiva e o percentual de espermatozoides com movimentos rápidos (Figura 8).

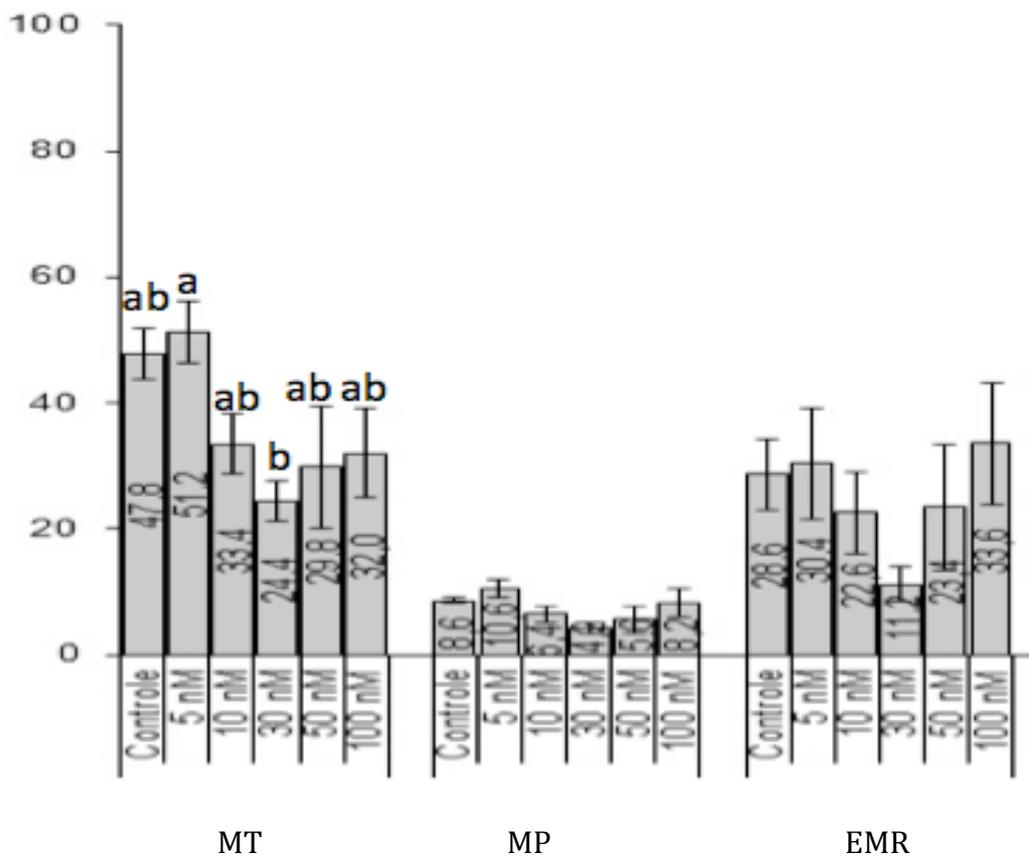


Figura 8. Percentual médio de motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides com movimentos rápidos de sêmen equino refrigerado com 72 h de avaliação, em diluente comercial suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100 nM de wortmannin. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de um total de cinco ejaculados, obtidos de cinco garanhões.

Sêmen Congelado:

O tratamento do sêmen equino com o inibidor da PI3K, durante o congelamento não alterou significativamente ($P > 0,05$) a motilidade total, a motilidade progressiva e o percentual de espermatozoides com movimentos rápidos, em nenhuma das dosagens utilizadas (Figura 9).

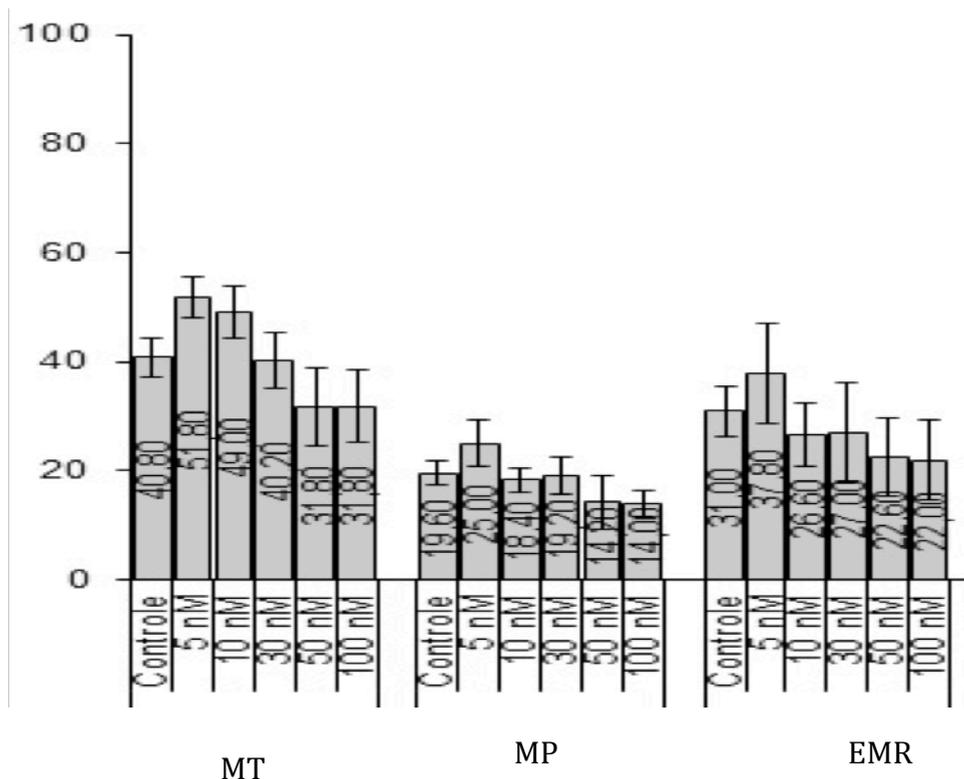


Figura 9. Percentual médio de motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides com movimentos rápidos de sêmen criopreservado, em diluente comercial suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100 nM de wortmannin. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de um total de cinco ejaculados, obtidos de cinco garanhões.

Integridade da membrana plasmática e acrossomal, e atividade mitocondrial

Visando determinar o efeito dos tratamentos sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal, assim como a atividade mitocondrial, espermatozoides equinos congelados/descongelados foram submetidos à marcação fluorescente com iodeto de propídio, FITC-PSA e JC-1. Nenhuma diferença significativa ($P > 0,05$) foi encontrada entre os diferentes tratamentos para nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 10).

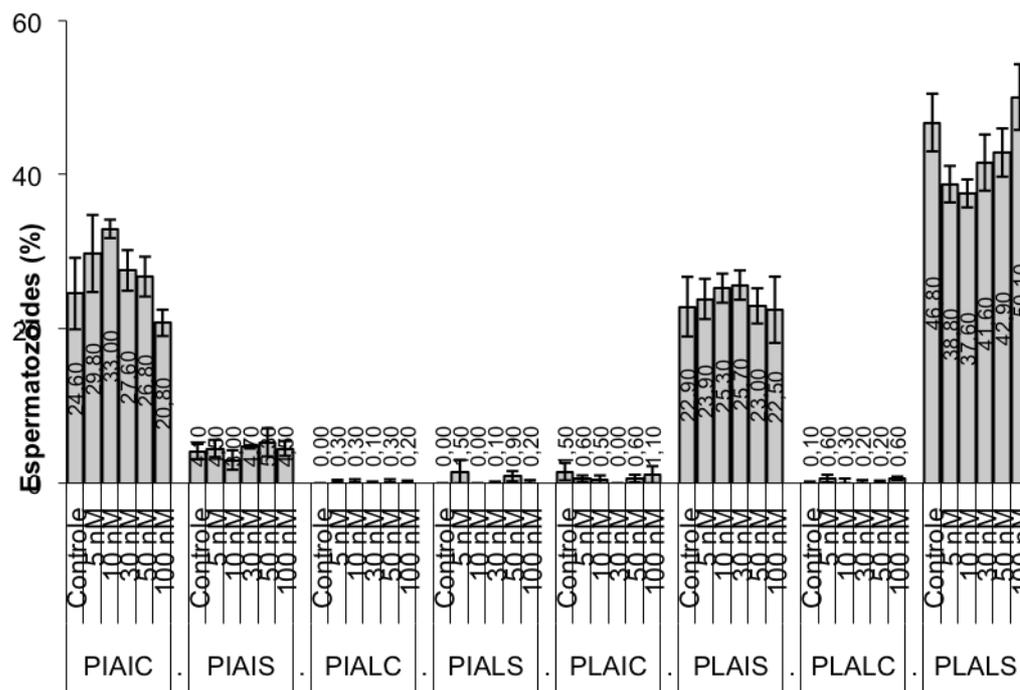


Figura 10: Percentual de espermatozoides equinos criopreservados em diluente comercial suplementado com 0, 5, 10, 30, 50 e 100 nM de wortmannin, marcados pelo iodeto de propídio, FITC-PSA e JC1.

Teste hiposmótico

A avaliação da funcionalidade de membrana plasmática dos espermatozoides equinos congelados/descongelados, determinada pelo teste hiposmótico, demonstrou que as amostras tratadas com 10 nM de *wortmannin* apresentaram um percentual de espermatozoides íntegros significativamente maior ($P < 0,05$) que as amostras tratadas com 50 e 100 nM do inibidor da PI3K. Nenhuma diferença significativa ($P > 0,05$) foi observada entre os espermatozoides tratados com 0 (controle), 5, 10 e 30 nM do *wortmannin* (Figura 11).

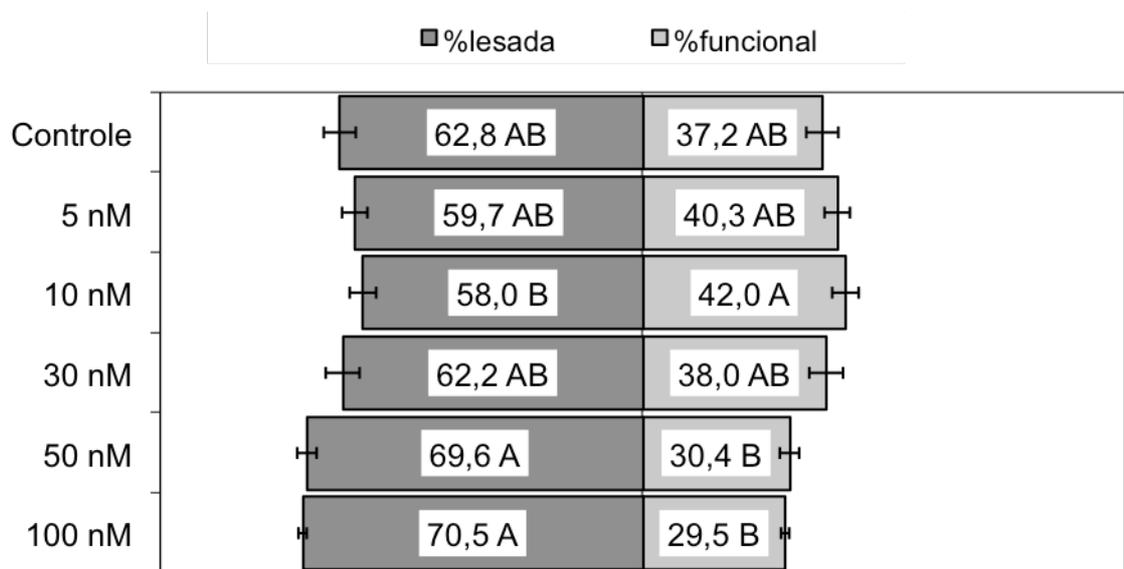


Figura 11. Efeito do congelamento do sêmen equino tratado com diferentes concentrações de *wortmannin*, sobre o percentual de espermatozoides lesados e íntegros ao teste hiposmótico.

7- DISCUSSÃO

A via PI3K/AKT tem sido demonstrada em espermatozoides de humanos, hamsters, suínos, bovinos, corvina do atlântico e aves. Ela participa de processos importantes da função espermática como motilidade, capacitação e reação acrossômica (APARICIO et al., 2005; ASHIZAWA et al., 2008; BREITBART et al., 2014; KOPPERS et al., 2011; LUCONNI et al., 2001, 2005, 2006; NAGDAS et al., 2002; PATIL et al., 2013; TAN et al., 2014). Em equinos, nosso estudo é o primeiro a demonstrar a participação da PI3K na motilidade espermática. No entanto, a regulação da atividade da PI3K pelo wortmannin no sêmen *in natura*, não resultou em diferenças ($P > 0,05$) dos parâmetros avaliados (Figura 5). Possivelmente esse resultado se deve às baixas concentrações, assim como o tempo de exposição (2 h) ao inibidor utilizados.

Koppers et al. (2011) demonstraram que o wortmannin apresentou um efeito dose e tempo dependente em espermatozoides humanos. Após 4 h de incubação dos espermatozoides em meio contendo 5 mM do inibidor, a motilidade espermática foi drasticamente reduzida. Diferentemente, diversos autores têm demonstrado que o uso dos inibidores da PI3K, LY294002 e wortmannin, leva a um aumento da motilidade de espermatozoides de humanos, suínos, de corvina do Atlântico e de hamster, quando usados em concentrações nano e micromolares (LUCONNI et al., (2001, 2004, 2006), NAGDAS et al., 2002; DU PLESSIS et al., 2004; APARICIO et al., 2005; TAN et al., 2014). Segundo Tan et al. (2014) a inibição da PI3K pode atuar de forma diferente de acordo com a espécie estudada e o inibidor da PI3K utilizado. Du Plessis et al. (2004) descreveram um aumento na motilidade total e progressiva de espermatozoides humanos tratados com 10 μ M de LY294002. Resultados similares foram descritos por Luconni et al. (2001 e 2004) após submeterem espermatozoides de humanos e de ratos, ao tratamento também com 10 μ M de LY294002. No entanto, espermatozoides de suínos tratados com 100 μ M de LY294002, não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) na motilidade (APARICIO et al., 2005).

O resultado nas amostras refrigeradas variou em decorrência do tempo do resfriamento (24, 48 ou 72 h). A avaliação das amostras resfriadas por 24 h mostrou que a adição de 5 nM de wortmannin aumentou a motilidade total e progressiva,

assim como o percentual de EMR, em relação às amostras tratadas com 10 e 30 nM do inibidor (Figura 6), indicando um efeito dose resposta.

Esse resultado também indica que o efeito do tratamento dos espermatozoides com o *wortmannin*, é tempo dependente, uma vez que nenhuma diferença ($P > 0,05$) sobre a motilidade foi observada nas amostras de sêmen *in natura* mantidas por 2 h na presença do inibidor (Figura 5). Esses resultados corroboram os achados de Koppers et al. (2011), que encontraram diferença na motilidade espermática apenas após as 4 h de incubação dos espermatozoides humanos com *wortmannin*.

Entretanto, as avaliações realizadas às 48 e 72 h de resfriamento mostraram um resultado semelhante ao descrito acima, apenas em relação à motilidade total. Nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi observada em relação à motilidade progressiva e EMR, possivelmente devido à redução natural dos valores obtidos, em decorrência do longo tempo de estocagem, fato este comprovado pelos resultados do grupo controle.

Curiosamente nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi observada nos parâmetros avaliados nas amostras resfriadas em diluente contendo 50 e 100 nM do *wortmannin* (Figuras 7 e 8).

No presente estudo a regulação da atividade da PI3K no congelamento do sêmen equino não apresentou alterações significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Resultados similares foram observados com sêmen humano criopreservado em diluente suplementado com LY294002 (LUCONNI et al., 2001) e espermatozoides espermatozoides ovinos e bovinos criopreservados em diluente contendo *wortmannin* (TORRES, 2013; SOUZA, 2015).

Tais resultados podem ter sido decorrentes do pequeno período de tempo em que os espermatozoides permaneceram em contato com o inibidor da PI3K, em decorrência da curva de resfriamento utilizada durar apenas vinte minutos para que as amostras atingissem 5 °C, temperatura na qual o metabolismo espermático é fortemente reduzido (PAPA, 2007).

Durante o congelamento e descongelamento os espermatozoides ficam susceptíveis a lesões da membrana plasmática decorrentes da formação de cristais de gelo, alterações osmóticas das soluções crioprotetoras, assim como pela ação tóxica dos crioprotetores. Da mesma forma tem sido descrito que o processo de criopreservação induz a capacitação prematura, com consequente indução da

reação acrossômica (CANISSO et al., 2008; FULLER e WHITTINGHAM, 1997). Não está claro se a PI3K está envolvida no processo de capacitação espermática, porém existem evidências de sua participação na reação acrossômica (ICKOWICZ et al., 2012).

Diante disso, em nosso trabalho foram realizadas marcações fluorescentes para determinar o efeito da regulação da atividade da PI3K sobre a reação acrossômica, assim como a integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial, pela associação das sondas fluorescentes PI, FIT-PSA e JC-1. A análise das amostras logo após o descongelamento mostrou que a maioria dos espermatozoides se enquadrava no grupo PLALS (membrana plasmática lesada, acrossoma reagido e baixa atividade mitocondrial), indicando o efeito lesivo do congelamento sobre a viabilidade espermática. Porém, o *wortmannin* não interferiu ($P > 0,05$) em nenhum dos parâmetros avaliados, independente da concentração utilizada.

Apesar da PI3K estar envolvida em importantes funções celulares, como a sobrevivência e proliferação celular, a remodelação do citoesqueleto e o metabolismo energético (ZHENG e LIU, 2011), as concentrações e tempo de exposição ao *wortmannin* utilizados no presente trabalho podem ter sido insuficientes para causar efeitos deletérios ou inibir a reação acrossômica dos espermatozoides de equinos. Diferentemente, Fisher et al. (1998) demonstraram um efeito dose-resposta na inibição da reação acrossômica de espermatozoides humanos tratados com 10, 50 e 100 nM de *wortmannin*.

Tem sido demonstrado que o *wortmannin* pode aumentar o percentual de células apoptóticas, lesão de membranas espermáticas e danos oxidativos ao DNA, devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (KOPPERS et al., 2011), efeito semelhante aos encontrados em espermatozoides criopreservados (MAZUR, 1977; STEPONKUS, 1983). Devido a isso buscou avaliar a funcionalidade da membrana plasmática com a utilização do teste hiposmótico (HOST). O HOST é um teste simples, rápido e seu uso tem sido recomendado como um indicador adicional de fertilidade (NEILD et al., 1999).

Alterações significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre as amostras tratadas com o *wortmannin*, quando avaliadas pelo HOST. O tratamento de 10 nM do inibidor apresentou um menor número de células lesadas em relação aos tratamentos de 50 e 100 nM, evidenciando um efeito dose resposta.

Além da possibilidade de danos a membrana pela indução de espécies reativas de oxigênio pelo *wortmannin* (Koppers et al. 2011), a PI3K está envolvida em vários processos que regulam a funcionalidade da membrana plasmática indiretamente devido à sua atuação na regulação da relação entre fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2) e fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). Apesar desses fosfoinositídeos representarem menos de 1 % dos fosfolipídios da membrana plasmática, apresentam função crucial em diversos processos, como endocitose, fagocitose, adesão da membrana ao citoesqueleto (CZECH, 2000). Dessa forma, o aumento no percentual de células lesadas, detectadas pelo HOST, nas amostras tratadas com maiores concentrações do *wortmannin*, pode ser decorrente do efeito do aumento da geração de espécies reativas de oxigênio pelo inibidor, mas também pela interferência causada pelo *wortmannin* na relação PIP2/PIP3, o que pode interferir com importantes processos bioquímicos, responsáveis pela funcionalidade da membrana plasmática.

8- CONCLUSÃO

Conclui-se que a PI3K está envolvida na motilidade espermática de equinos resfriados e na funcionalidade de membrana do sêmen congelado e que, nas condições desse trabalho, a regulação da PI3K pelo *wortmannin* não melhorou a motilidade espermática.

9- REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M.A.; GRAHAM, J.K.; KEITH, S.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.F.; SQUIRES, S.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. 14th INTERNACIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, Proceedings...Stockholm , p.157, 2000.
- ALVARENGA et al. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: Workshop on Transporting Gametes and Embryos, Havemeyer Foundation. **Proceedings**, p.74-76, 2003.
- ALVARENGA MA, PAPA FO, LANDIM-ALVARENGA FC, MEDEIROS ASL. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review.**Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: Mckinnon AO, VOSS JL(Ed). **Equine reproduction** Philadelphia: Lea & Febiger , p. 715-745, 1993.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- ANDERSON, K.E., JACKSON, S.P. Class I phosphoinositide 3-kinases. Int. J. Biochem.**Cell. Biol.** 35, 1028–1033, 2003.
- ANDERSON, R. A., BORONENKOV, I. V. & DOUGHMAN, S. D.Phosphatidylinositol phosphate kinases, a multifaceted family of signalling enzymes. **Journal of Biological Chemistry** 274, 9907– 9910, 1999.
- APARICIO, I.M., GIL, M.C., GARCIA-HERREROS, M., PENA, F.J., GARCIA-MARIN, L.J.Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase modifies boar sperm motion parameters. **Reproduction** 129, 283–289, 2005.
- ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade de touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Brasil, 2002.

- AURICH C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.
- AURICH,E.J. Artificial Insemination in Horses : More than a Century of Praticce and Research. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32 , n. 8, p. 458-463, 2012.
- AURICH J., AURICH C. Developments in european horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. **Reproduction Domestic Animals**, v. 41, n. 4, p. 275-279, 2006.
- BAILEY JL, BILODEAU JF, CORMIER N. Sperm cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J Androl.**;21:1-7,2000.
- BALL BA, VOSS A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **J Androl.**;22:1061-9, 2001.
- BAUDOT A, BOUTRON P. Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide. **Cryobiology**, v.37, p.187-199, 1998.63, 2012.
- BLEIL, J.D.,WASSARMAN, P.M. Sperm–egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. **Dev. Biol.** 95, 317–324, 1983.
- BREITBART H., ROTMAN T, RUBINSTEIN S, ETKOVITZN.Review Role and regulation of PI3K in sperm capacitation and the acrosome reaction.**Molecular and Cellular Endocrinology** 314 234–238, 2010.
- BREITBART H. Intracellular calcium regulation in spermcapacitation and acrosomal reaction. **Mol Cell Endocrinol**;187:139-44, 2002.
- BRINSKO, STEVEN P. Insemination Doses: how low can we GO? **Rev Theriogenology**. V. 66. p. 543-550, 2006.
- BOCHIO,L;InseminaçãoArtificial;ABQM
<<http://www.abqm.com.br/SecaoTecnica/Inseminação.asp>> Acesso em 10/02/2015.
- CANDEIAS, M.L. Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. Dissertação(Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 2010.
- CANTLEY, L.C.,. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science** 296, 1655–1657, 2002.

- CHAMBERLAND, A. et al. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. **Theriogenology** 55, p.823-835, 2000.
- CHIRINEA V.H., SICHERLE C.C.,LOPESM.D. Congelamento de sêmen e sua eficiência na inseminação artificial de cães. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.164-168, 2013.
- COHEN, G., RUBINSTEIN, S., GUR, Y., BREITBART, H. Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation. **Dev. Biol.** 267, 230–241, 2004.
- COTTON, L., GIBBS, G.M., SANCHEZ-PARTIDA, L.G., MORRISON, J.R., DE KRETZER, D.M., O'BRYAN, M.K. FGFR-1 [corrected] signaling is involved in spermiogenesis and sperm capacitation. **J. Cell Sci.** 119, 75–84, 2006.
- CZECH, MP. PIP2 and PIP3: Complex Roles at the Cell Surface Cell, Vol. 100, 603–606, 2000.
- DEALS, P. F. New technics of artificial insemination in the mare. International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. nov.. p. 1-4,2003.
- DU PLESSIS, S.S., FRANKEN, D.R., BALDI, E., LUCONI, M. Phosphatidylinositol 3- kinase inhibition enhances human sperm motility and sperm-zona pellucida binding. **Int. J. Androl.** 27, 19–26, 2004.
- DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S; ALVARENGA, M.A.; LEONARDO, H. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 189-191, 2002.
- CELEGHINI, E,C,C. Efeitos da criopreservação do semen bovino sobre as membranas plasmatica, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ETKOVITZ, N., RUBINSTEIN, S., DANIEL, L., BREITBART, H.Role of PI3-kinase and PI4- kinase in actin polymerization during bovine sperm capacitation. **Biol. Reprod.** 77, 263–273, 2007.
- FENG H, SANDLOW JI & SANDRA A. The c-kit receptor and its possible signaling transduction pathway in mouse spermatozoa. **Molecular Reproduction**

- and Development** 49 317–326, 1998.
- FICARRO, S., CHERTIHIN, O., WESTBROOK, V. A., WHITE, F., JAYES, F., KALAB, P., MARTO, J. A., SHABANOWITZ, J., HERR, J. C., HUNT, D. F. AND VISCONTI, P. Phosphoproteome analysis of capacitated human spermatozoa. **J. Biol. Chem.** 278, 11579-11589, 2003.
- FISHER, H. M., BREWIS, I. A., BARRAT, C. L. Phosphoinositide 3-kinase is involved in the induction of the human sperm acrosome reaction downstream of tyrosine phosphorylation. **Molecular Human Reproduction** 4, 849–855, 1998.
- FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; CRESPILO A.M. ;PAPA F.O.; DELL'AQUA JUNIOR J.A. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.213-222, 2009.
- FRUMAN, D. A., MEYERS R. E., CANTLEY L. C., **Annu. Rev. Biochem.** 67, 481, 1998.
- FUKAMI, K., YOSHIDA, M., INOUE, T., KUROKAWA, M., FISSORE, R.A., YOSHIDA, N. Phospholipase Cdelta4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. **J. Cell. Biol.** 161, 79–88, 2003.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America*: **Equine Practice**, v.12, n.1, p.131-147, 1996.
- GUAN, L., SONG, K., PYSZ, M.A., CURRY, K.J., HIZLI, A.A., DANIELPOUR, D., ET AL. Protein kinase C-mediated down-regulation of cyclin D1 involves activation of the transcriptional repressor 4E-BP1 via a phosphoinositide 3-kinase/Akt-independent, protein phosphatase 2A-dependent mechanism in intestinal epithelial cells. **J. Biol. Chem.** 282, 14213–14225, 2007.
- GUERRA MMP, EVANS G, MAXWELL WMC. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia. **Rev Bras Reprod Anim**, v.28, p.187-195, 2004.
- HAFEZ, E. S. E. & HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7 ed., p. 381- 394, 2004.
- HARRISON RA. Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. **Molecular Reproduction and Development** 67 337–352, 2004.
- HARTWIG FP, PAPA FO, DELL'AQUA JUNIOR J. Utilização do colesterol na criopreservação de espermatozoides na espécie equina: Uma revisão. *Vet. e Zootec. jun.*; 19(2): 157-168, 2012.
- HENRY, M.; SNOECK, P.P.N.; COTORELLO, A. C. P. Post-thaw spermatozoa

- plasma integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 245-248, 2002.
- HO, H. C. AND SUAREZ, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction** 122, 519-526, 2001.
- HOLT WV & HARRISON RA. Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. **Journal of Andrology** 23 557–565, 2002.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000.
- HOLT WV, HEAD MF, NORTH RD. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biol Reprod**, v.46, p.1086-1094, 1992.
- HOPKINS, F.M.; MEADOWS, D.G. Cooled Shipped Horse Semen. In Equifacts. The University of Tennessee, 2003.
- ICKOWICZ D et al. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian Journal of Andrology** 14, 816–821, 2012.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da pecuária municipal. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 24/02/2015.
- JHA, K. N. AND SHIVAJI, S. Identification of the major tyrosinephosphorylated protein of capacitated hamster spermatozoa as a homologue of mammalian sperm a kinase anchoring protein. **Mol. Reprod. Dev.** 61, 258-270, 2002.
- JASKO, D.P. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, v. 10, n. 2, p. 156-165, 1994.
- JUNGNICKEL, M.K., MARRERO, H., BIRNBAUMER, L., LEMOS, J.R., FLORMAN, H.M. Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. **Nat. Cell. Biol.** 3, 499–502, 2001.
- JUNGNICKEL, M.K., SUTTON, K.A., WANG, Y., FLORMAN, H.M. Phosphoinositide dependent pathways in mouse sperm are regulated by egg ZP3 and drive the acrosome reaction. **Dev. Biol.** 304, 116–126, 2007.
- KASTO, R.; OKKENHAUQ, K.; AHMADI, K.; BRANCO, S.; TIMMS, J.; WATERFIELD MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications

- for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cellular Dev Biol.* 17:615-75., 2001.
- KEITH SL. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.62, p.1056-1065,1998.
 - KEITH SL, SQUIRES EL, GRAHAM JK, BRINSKO SP. Evaluation of cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Colorado: CDU, 2000.
 - KOPPERS A.J. et al. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. **Biochem. J.** 436, 687–698, 2011.
 - LIMA R.A.S.; SHIROTA R.; BARROS G.S.C. Estudo do complexo do agronegocio do cavalo. Centro de estudos de economia aplicada , CEPEA/ ESALQ/ USP. Piraciaba, 2006.
 - LEÃO, K.M. Inseminação artificial por endoscopia com número reduzido deespermatozóides utilizando sêmen fresco e congelado de garanhões, 2002.
 - LECLERC, P., DE LAMIRANDE, E. AND GAGNON, C.Cyclic adenosine 3,5 monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. **Biol. Reprod.** 55, 684-692, 1996.
 - LECLERC, P. AND GOUPIL, S.Regulation of the human sperm tyrosine kinase . Activation by cyclic adenosine 3,5-monophosphate andinhibition by Ca(2+). **Biol. Reprod.** 67, 301-307, 2002.
 - LEIBO SP, BRADLEY L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon C (Ed.). The male gamet: from basic science to clinical applications. Vienna, IL: **Cache River Press** , p.501-516, 1999.
 - LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. *Veterinary Clinics North American Equine Practice*, v. 22, n. 3, p. 663-676, 2006.
 - LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v.68, p. 191-200, 2001.
 - LOVE,C.C. Measurement of Concentration and Viability in Stalion Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32,8,p.464-466, 2012.
 - LUCONI, M., MARRA, F., GANDINI, L., FILIMBERTI, E., LENZI, A., FORTI, G. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition enhances human sperm motility. *Hum. Reprod.* 16, 1931–1937, 2001.

- LUCONI M, CARLONI V, MARRA F, FERRUZZI P, FORTI G & BALDI. Increased phosphorylation of AKAP by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances human sperm motility through tail recruitment of protein kinase A. **Journal of Cell Science** 117 1235–1246, 2004.
- LUCONI, M., TORCIA, S., GRILLO, D., FIORENZA, M.T., FORTI, G., MANGIA, F. Enhancement of mouse sperm motility by the PI3-kinase inhibitor LY294002 does not result in toxic effects on preimplantation embryo development. **Hum. Reprod.** 20, 3500–3504, 2005.
- LUO, J., CANTLEY, L.C. The negative regulation of phosphoinositide 3-kinase signaling by p85 and its implication in cancer. **Cell Cycle** 4, 1309–1312, 2005.
- MAZUR P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**. 14:251–72, 1977.
- MEDEIROS ASL. Utilização de vários tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhão. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP: 2003
- MEDEIROS CMO, FORELL F, OLIVEIRA ATD, RODRIGUES JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**; 57:327-44, 2002.
- MELO CM, ZAHN FS, MARTIN I, ORLAND C, DELL'AQUA JR JA, ALVARENGA MA, PAPA FO. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. **J Equine Vet Sci**, v.27, p.171-175, 2007.
- MOFFET, P.D. Comparison of dimethyl-formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. Proc. Soc. For Theriogenology Ann. Conf **Abstract**...p.42, 2003.
- MOORE AI, SQUIRES EL, GRAHAM JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, 51:241-9, 2005.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; Embriologia Básica. 6ª edição. Elsevier. Rio de Janeiro,. ISBN 85-352-1369-1, 2004.
- NAGDAS SK, WINFREY VP & OLSON GE. Identification of ras and its downstream signaling elements and their potential role in hamster sperm motility. **Biology of Reproduction** 67 1058–1066, 2002.
- NAUC, V.; LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GANGNON, C.; Inhibitors of phosphoinositide 3-kinase, LY294002 and wortmannin, affect sperm

- capacitation and associated phosphorylation of proteins differently: Ca²⁺-dependent divergences. **Journal of Andrology**, Vol. 25, N°. 4, 2004.
- NEILD D., CHAVES G., FLORES M., MORA N., BECONI M. AND AGIHEROA. HYPOOSMOTIC TEST IN EQUINE SPERMATOZOA. **Theriogenology**, 51:721-727, 1999.
- NUNES, DANIELA BRANDÃO; ZÚCCARI CARMEM ESTEFÂNIA SERRA NETO; SILVA ELIANE VIANNA DA COSTA. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte. v. 30,. n° 1/2, p. 42-56, 2006.
- PAPA, F. O. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p. 19-27, Suppl. 1.2005.
- PAPA, FREDERICO OZANAM; ALVARENGA, MARCO ANTONIO; DELL'AQUA JR, ANTONIO. Manual de Andrologia e Manipulação de Sêmen Equino. 32f. São Paulo, 2007.
- PATIL, S. B., KULANAND, J., PADMA, P. AND SHIVAJI, S. Reactivation of motility of demembrated hamster spermatozoa: role of protein tyrosine kinase and protein phosphatases. *Andrologia* 34, 74-86, 2002.
- PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A. A yolk buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal Dairy Science**, v.23, p.399-404, 1940.
- PICKETT BW, AMANN RP. Cryopreservation of semen. In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.769-789, 1993.
- PURDY PH. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Rumin Res**, v.63, p.215-225, 2006a.
- REID AT, REDGROVE K, AITKEN RJ, NIXON B. Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J Androl*. 13:88-96, 2011;
- SALAMON S, MAXWELL WMC. Storage of ram semen. **Anim Reprod Sci**, v.62, p.77-111, 2000.
- SAMPER, J. C.; ESTRADA, A. J.; MCKINNON, A. O. Insemination with frozen semen. In: Current therapy in equine reproduction. Saint Louis: **Elsevier-Saunders**, p. 285-288, 2007.
- SALICIONI, A. M.; PLATT, M. D.; WERTHEIMER, E. V.; ARCELAY, E.; ALLAIRE, A.; SOSNIK, J.; VISCONTI, P. E.; Signalling pathways involved in sperm

- capacitation.. Department of veterinary and animal sciences, University of Massachusetts, USA, 2007.
- SILVA ECB, CAJUEIRO JFP, SILVA SV, GUERRA MMP. Crioprotetores etileno glicol ou acetamida na viabilidade in vitro de espermatozoides congelados de ovinos. **Cienc Rural**, v.42, n.6, 2012a.
 - SILVA ECB, CAJUEIRO JFP, SILVA SV, VIDAL AH, SOARES PC, GUERRA MMP. In vitro evaluation of ram sperm frozen with glycerol, ethylene glycol or acetamide. **Anim Reprod Sci**, v.132, p.155-158, 2012b.
 - SILVA AR, FONTENELE-NETO JD, CARDOSO RCS, SILVA LDM, CHINIRÉA VH, LOPES MD. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. *Ciênc Anim Bras*, v.10, p.595-601, 2009a.
 - SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.370-384, out./dez. 2011.
 - SINGH BK. Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda. São Paulo: Andrei Editora,. 331p, 2006.
 - SIPEKI, S., BANDER, E., PARKER, P.J., FARAGO, A. PKC alpha reduces the lipid kinase activity of the p110alpha/p85alpha PI3K through the phosphorylation of the catalytic subunit. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 339, 122–125, 2006.
 - SPUNGIN B, BREITBART H. Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J Cell Sci*;109 Pt 7:1947---55, 1996.
 - SQUIRES EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, 1999.
 - STEPONKUS PL, DOWGERT MF, GORDON-KAMM WJ. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze–thaw cycle: the influence of cold acclimation. **Cryobiology**, 20:448–65, 1983.
 - TAN W., THOMAZ P. Activation of the Pi3k/Akt pathway and modulation of phosphodiesterase activity via membrane progesterin receptor-alpha (mPRalpha) regulate progesterin-initiated sperm hypermotility in Atlantic croaker. **BOR Papers in Press**, 2014

- TASH, J. S. AND BRACHO, G. E. Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases. **J. Androl.** 15, 505-509, 1994.
- TULSIANI DAULAT R.P., Aïda Abou-haila. Review Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 485, 72–81, 2009.
- UI, M.; OKADA, T.; HAZEKI, T.; HAEKI, O. O Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem Sci*, v.20, 303-307, 1995
- VANHAESEBROECK, B. Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. **Mol Cell Biol**, v.16, 1722-1733. 1996.
- VIDAMENT, M. Motility and fertility of stallion frozen with glycerol and/ or dimethyl-formamide. *Theriogenology*, n. 58, p.1-3, 2002.
- VIJAYARAGHAVAN, S., TRAUTMAN, K. D., GOUELI, S. A. AND CARR, D. W. A tyrosine-phosphorylated 55-kilodalton motility-associated bovine sperm protein is regulated by cyclic adenosine 3,5-monophosphates and calcium. **Biol. Reprod.** 56, 1450-1457, 1997a.
- VISCANTI, P.E., WESTBROOK, V.A., CHERTIHIN, O., DEMARCO, I., SLEIGHT, S., DIEKMAN, A.B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **J. Reprod. Immunol.** 53, 133–150, 2002.
- WATSON PF. The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**: V.60-61, p.481-492, 2000.
- WATSON PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev**, v.7, p.871-891, 1995.
- WATSON PF. The effects of cold shock on sperm membranes. In: Clarke A, Morris GJ (Ed.). *Effects of low temperatures on biological membranes*. London: **Academic Press**, p. 189-218, 1981.
- WITTE TS, SCHÄFER-SOMI S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Anim Reprod Sci*;102(3-4):181-93,2007.
- YANAGIMACHI, R. In. E. KNOBIL, J. D. NEILL (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York, p. 189-317, 1994.
- YANG, J., LIU, J.H., GONG, X.X., WANG, T., CHEN, J., CHEN, Z. Influence of

LY294002 on sperm motility in asthenozoospermia patients in vitro. *Zhonghua Nan Ke Xue* 12, 311–314, 2006.

-ZHENG, W.; LIU, K. The emerging role of maternal phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) signaling in manipulating mammalian preimplantation embryogenesis. **Cell Cycle (Landes Bioscience)**, 10:2, 178-179; January 15, 2011.