

ANDRÉ MARIANO BATISTA

Influência das técnicas de seleção *Swim-up* e gradiente de densidade (Percoll[®] e CapriPure[®]) na viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino

RECIFE

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ANDRÉ MARIANO BATISTA

Influência das técnicas de seleção *Swim-up* e gradiente de densidade (Percoll[®] e CapriPure[®]) na viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Maria Madalena Pessoa Guerra

RECIFE

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

B333i Batista, André Mariano
 Influência das técnicas de seleção Swim-up e gradiente de densidade (Percoll[®] e CapriPure[®]) na viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino / André Mariano Batista. -- 2009.
 53 f.: il.

 Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra
 Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.
 Inclui bibliografia.

CDD 636.089 390 824

1. Sêmen
 2. Espermatozoide
 3. Swim-up
 4. Percoll[®]
 5. CapriPure[®]
 6. Preparação espermática
- I. Guerra, Maria Madalena Pessoa
II. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

Influência das técnicas de seleção *Swim-up* e gradiente de densidade (Percoll[®] e CapriPure[®]) na viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino

Dissertação de Mestrado elaborada e defendida por

ANDRÉ MARIANO BATISTA

Aprovada em 12 / 02 / 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. MARIA MADALENA PESSOA GUERRA
Orientadora – Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Dr^a. ANDRÉIA FERNANDES DE SOUZA
LIKA-UFPE

Prof^a. Dr^a. ÁUREA WISCHRAL
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

Prof. Dr. GUSTAVO FÉRRER CARNEIRO
Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Àquela que por toda sua vida dedicou-me todo amor e carinho, a minha
Mãe - outra **Izabel Mariano de Lima** (in memoriam),
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de crescimento e aprendizagem em mais uma fase de espição terrena;

Aos meus avós Odilon Cosmo Mariano e Izabel Mariano de Lima (in memória), aos meus pais Severino José Batista (in memória) e Zilda Cosmo Mariano Batista e à minha tia Gilza Cosmo Mariano, pela educação, formação, dedicação, amor e carinho com que me tratam;

Aos meus irmãos Anderson e Alyne Mariano e minhas primas Janyne e Patrícia Mariano pelo incentivo e compreensão;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Madalena Pessoa Guerra, por quem tenho grande admiração e respeito, por sua elegância e discrição, sua inteligência e competência profissional, agradeço pela orientação e aconselhamentos, pelas oportunidades, liberdade, confiança e respeito com que me trata;

A Sildivane Valcácia Silva, sobretudo pela amizade, respeito e admiração, agradeço pela compreensão, pela troca de experiências e pelos conhecimentos adquiridos com a convivência com essa pessoa admirável;

À minha namorada Ilka Cordeiro, pela atenção, carinhos, incentivos, paciência e compreensão, sobretudo durante a fase de elaboração da dissertação;

Às minhas amigas pessoais Érica Moraes (minha comadre), Adriana Soares, Andréia Souza, e ao amigo Flávio Mergulhão, pela admiração mútua e a permanente disposição em ajudar;

À equipe do ANDROLAB, Andréa Vidal, Ellen Cordeiro, Felipe Costa, Jobson Filipe, Anny Kaline, Clarissa Neuman (agora Veterinária), por suportarem toda minha chatice, agradeço pela compreensão;

Aos Profs. Áurea Wischral e Rinaldo Mota, pela disposição e dedicação, sempre prontos a ajudar e orientar nas mais diversas questões;

Aos funcionários D. Sonia, Joana D'arc, Alcir, Guiomar, Edna e Tom, pela atenção e ajuda, e a Ana Katharina, bibliotecária, por toda presteza e esforço em conseguir os mais difíceis artigos científicos;

Àqueles que viabilizaram a realização do trabalho, ao CNPq pela concessão de bolsa, à EMEPA pela concessão do uso dos reprodutores, à Dr^a. Emma Holms (Nidacon Laboratories AB, Göthenborg, Sweden) pela doação do CapriPure[®] e ao Dr. Paulo Gouveia pela doação das doses de sêmen criopreservado com diluidor à base de gema de ovo;

Aos amigos da pós-graduação, Ligia Buzzá, Eduardo Faria, Andréia Pequeno, Fernanda (peixe-boi), Márcio, Paula Lemos, Grazielle, Bartira, pela troca de conhecimentos multidisciplinares;

Aos amigos da graduação, Clarissa, Priscila, Daniela, Vanessa, Joyce, Álvaro Borba, Marlon, Elton, Lucas, Tales, Fred, Diogo, Jowmol, pela admiração e respeito.

RESUMO

Métodos de processamento espermático são rotineiramente utilizados nos sistemas de fertilização *in vitro* (FIV) de várias espécies, com o objetivo de remover o plasma seminal/crioprotetores e aumentar a qualidade espermática. Visando estudar a viabilidade espermática após utilização dos métodos *Swim-up* ou gradiente de densidade (Percoll[®] e CapriPure[®]) em amostras criopreservadas de sêmen caprino para uso em reprodução assistida, foram colhidas amostras de sêmen de seis reprodutores Boer. A seguir, as amostras foram avaliadas (motilidade progressiva, concentração, e morfologia), submetidas a duas lavagens em solução Tris, diluídas, envasadas em palhetas (0,25 mL), criopreservadas em máquina e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C). Após descongelação (37 °C; 30 segundos), procedeu-se à formação do *pool* das amostras dos reprodutores de cada dia de congelamento e, a seguir, a avaliação de integridade de membrana (IP/DCF), integridade acrossomal (FITC/PNA) e potencial de membrana mitocondrial (JC-1). Em seguida, o *pool* foi dividido em duas alíquotas para a realização da seleção espermática utilizando os métodos *Swim-up* e Percoll[®] (Experimento 1) e centrifugação em gradiente de densidade Percoll[®] e CapriPure[®] (Experimento 2). Após utilização de cada método de seleção, procederam-se às análises de motilidade progressiva, concentração, integridade de membrana, integridade acrossomal e potencial de membrana mitocondrial. No Exp. 1 foram constatados menores percentuais de espermatozoides portadores de motilidade progressiva ($P < 0,05$) e de espermatozoides com membranas intactas ($P < 0,01$) após utilização do método *Swim-up*, quando comparado as amostras submetidas à preparação espermática com Percoll[®]. No Exp. 2, o gradiente de Percoll[®] determinou redução ($P < 0,05$) no percentual de espermatozoides portadores de acrossoma intacto quando comparado ao percentual da amostra imediatamente após a descongelação, não havendo diferença significativa ($P > 0,05$) ao se comparar às amostras submetidas ao gradiente CapriPure[®]. Houve diferença significativa nos percentuais de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial nas amostras de sêmen submetidas à seleção utilizando os gradientes de densidade Percoll[®] ($P < 0,05$) e CapriPure[®] ($P < 0,01$), quando comparado aos valores das amostras avaliadas imediatamente após a descongelação. No entanto, nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi observada entre os percentuais de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial das amostras submetidas à seleção utilizando os gradientes de densidade Percoll[®] e CapriPure[®]. Com base nos resultados de espermatozoides móveis e com membranas intactas, é possível concluir que, para selecionar espermatozoides viáveis de amostras congeladas de sêmen caprino, deve-se usar a centrifugação em gradiente de densidade, e que o CapriPure[®] é uma boa alternativa ao uso do Percoll[®].

Palavras-chave: Preparação espermática, *Swim-up*, Percoll[®], CapriPure[®], caprino.

ABSTRACT

Sperm processing methods are routinely applied on the in vitro fertilization (IVF) systems for various species with the objective to remove seminal plasma/crioprotectant and to increase sperm quality. Aiming at study the sperm viability after use of the *Swim-up* or density gradient methods (Percoll[®] and CapriPure[®]) in frozen-thawed goat semen samples for use in assisted reproduction, six Boer goat semen samples were collected. Following, the samples were evaluated for concentration, progressive motility and morphology, diluted, packaged in straws (0.25 mL), frozen using machine and stored in liquid nitrogen. After thawing (37 °C for 30 s), sperm of all six goat were mixed-up making a pool and then were evaluated for progressive motility, membrane integrity (PI/DCF), acrossomal integrity (FITC/PNA) and mitochondrial membrane potential (JC-1). After that, the pool was split into two aliquots for the accomplishment of the sperm selection using the methods *Swim-up* and Percoll[®] (Experiment 1) and centrifugation in Percoll[®] and CapriPure[®] density gradient (Experiment 2). After use of each method of selection, the analyses was proceeded it from progressive motility, membrane integrity, acrossomal integrity and of mitochondrial integrity. Exp. 1 evidenced lower percentage of progressive motility spermatozoa ($P < 0.05$) with intact plasma membrane ($P < 0.01$) after use of *Swim-up* method, when compared with samples submitted to sperm preparation with Percoll[®]. In the Exp. 2, Percoll[®] gradient determined reduction ($P < 0.05$) in percentage of acrosome intact spermatozoa when compared with percentage of the sample immediately after thawing, not having significant difference ($P > 0.05$) if comparing submitted samples with the CapriPure[®] gradient. There were significant differences in the percentage of spermatozoa with high mitochondrial membrane potential in the samples of semen submitted the selection using Percoll[®] ($P < 0.05$) and CapriPure[®] ($P < 0.01$), density gradients, when compared with the values of samples evaluated immediately after thawing. However, there were no significant difference ($P < 0.05$) in the high mitochondrial membrane potential values between Percoll[®] and CapriPure[®] density gradients. On the basis the results of mobile spermatozoa and with the intact plasma membrane, are possible to conclude that to select viable sperm of frozen goat semen samples should use density gradient methods and CapriPure[®] is a good alternative to Percoll[®].

Key-words: Sperm preparation, *Swim-up*, Percoll[®], CapriPure[®], goat.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Espermatozoides caprinos corados por DCF/IP, portadores de membranas plasmáticas intactas (verde) e lesadas (vermelho).....	52
Figura 2. Espermatozoides caprinos submetidos à seleção em gradiente de concentração com Percoll®, corados por FITC/PNA, portadores de acrossomas intactos (AcI) e reagido (AcR) (1000x).....	52
Figura 3. Espermatozoides caprinos submetidos à seleção em gradiente de concentração com CapriPure®, corados por JC-1, apresentando elevado potencial de membrana mitocondrial (1000x).....	53

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Média e desvio padrão ($\bar{X} \pm$ D.P.) das características espermáticas de amostras criopreservadas de sêmen caprino imediatamente pós-descongelamento e após seleção utilizando os métodos <i>Swim-up</i> e gradiente de densidade Percoll [®]	51
Tabela 2. Média e desvio padrão ($\bar{X} \pm$ D.P.) das características espermáticas de amostras criopreservadas de sêmen caprino imediatamente pós-descongelamento e após seleção utilizando os meios para gradiente de densidade Percoll [®] e CapriPure [®] ..	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCF – Diacetato de carboxifluoresceína

FITC-PNA – Isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut Agglutinin*

FITC-PSA – Isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Pisum Sativum Agglutinin*

FIV – Fertilização *in vitro*

IA – Inseminação Artificial

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide

IP – Iodeto de propídio

JC-1 - 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide

PIV – Produção *in vitro*

PVP - Polivinilpirrolidona

ROS – Espécies reativas ao oxigênio

SCSA - Sperm Chromatin Structure Assay

TRA - Tecnologias de Reprodução Assistida

TALP - Tyrode's albumina lactato e piruvato

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Métodos de preparação espermática para uso na fertilização <i>in vitro</i>	14
2.1.1 <i>Swim-up</i>	15
2.1.2 Centrifugação em gradiente de densidade	17
2.2 Efeito da criopreservação do sêmen nas células espermáticas	20
2.3 Uso de sondas fluorescentes para avaliação espermática	21
2.3.1 Avaliação da membrana plasmática	21
2.3.2 Avaliação da membrana acrossomal	22
2.3.3 Avaliação da função mitocondrial	23
2.3.4 Avaliação da estrutura da cromatina	23
3 REFERÊNCIAS	25
4 ARTIGO CIENTÍFICO	34
4.1 Viabilidade espermática após utilização dos métodos <i>Swim-up</i> ou gradiente de densidade (Percoll® e CapriPure®) em amostras criopreservadas de sêmen caprino	35

1 INTRODUÇÃO

Na região Nordeste do Brasil a caprinocultura tem potencialidades para contribuir significativamente com o aumento da disponibilidade de produtos alimentícios, bem como gerar riqueza e renda, desde que explorada racionalmente para produção de carne, leite, pele, esterco e/ou pelo (SIMPLÍCIO, 2004).

Nos últimos anos, a caprinocultura tem crescido bastante, sendo considerada agronegócio de participação efetiva no desenvolvimento regional, abrangendo a comercialização de reprodutores e fêmeas de alta linhagem genética, produção de carnes e peles, assim como disponibilidade de germoplasma selecionado criopreservado, como sêmen e embriões. Neste contexto, devem-se dar atenção especial aos avanços tecnológicos visando promover o incremento da produção e da produtividade, melhorando consequentemente as condições sócio-econômicas da região (GONZALEZ et al., 2001).

A aplicação de tecnologias de reprodução assistida (TRA) permite que as taxas de progresso genético sejam aumentadas. A produção *in vitro* de embriões (PIV) nos pequenos ruminantes tem importância fundamental, principalmente por fornecer material para pesquisa básica em biologia e fisiologia do desenvolvimento embrionário a custo baixo e possibilitar a introdução comercial de biotécnicas como a transferência nuclear e a produção de animais transgênicos (BALDASSARRE et al., 2002; COGNIÉ et al., 2003).

Taxas de produção de blastocistos caprinos *in vitro* têm permanecido em torno de 25% por alguns anos, apesar de consideráveis esforços para promover seu aumento. O uso de fatores de crescimento, aminoácidos, diferentes tipos de energia, assim como o conhecimento dos requerimentos de oxigênio e temperatura têm sido investigados na tentativa de melhorar as taxas de produção (COGNIÉ et al., 2004). Todavia, as técnicas de preparação espermáticas têm recebido pouca atenção quando comparadas às de maturação de oócitos *in vitro*.

Métodos de preparação espermática são rotineiramente utilizados nos sistemas de fertilização *in vitro* (FIV) de várias espécies. Estes métodos têm o objetivo de remover o plasma seminal/crioprotetores, aumentar a qualidade espermática e, ao mesmo tempo, iniciar a capacitação espermática (PARRISH et al., 1995; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1997). Na preparação para FIV, os métodos usados para separação de espermatozóides móveis de amostras de sêmen incluem *Swim-up*, filtração diferencial em lâ de vidro e uso de procedimentos de centrifugação em gradiente de densidade. De acordo com o método utilizado, existem diferenças na separação de espermatozóides móveis e imóveis (DODE et

al., 2002). A centrifugação utilizada nestes métodos pode danificar os espermatozoides através da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, da peroxidação de membranas espermáticas, causando efeitos negativos na fusão espermatozóide-oócito (WATSON, 2000).

Recentes estudos têm caracterizado a qualidade espermática através de concentração e motilidade, além de integridade de membrana, acrossoma e cromatina, as quais podem ser avaliadas por métodos de coloração fluorescente (SILVA e GADELLA, 2006). Em contraste às numerosas comparações de tratamento espermático para FIV em bovinos e humanos (PALOMO et al., 1999; RHO et al., 2001), poucas comparações diretas têm sido relatadas para caprinos.

Diante do exposto, objetivou-se estudar a viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino submetidas às técnicas de seleção *Swim-up* e gradiente de densidade (Percoll[®] e CapriPure[®]) para uso em tecnologia de reprodução assistida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Métodos de preparação espermática para uso na fertilização *in vitro*

Uma amostra de sêmen é composta de fluido seminal, espermatozóides, células imunológicas e epiteliais, debris celulares e micro-organismos, os quais participam da sobrevivência espermática. No entanto, espermatozóides humanos mantidos em contato com plasma seminal por períodos maiores que 30 minutos podem perder sua habilidade fertilizante (MORTIMER, 2000).

Os espermatozóides presentes no ejaculado de todos os mamíferos, incluindo humanos, são incapazes de realizar a fertilização quando colocados em contato com o oócito no momento da ejaculação. Desta forma, estes gametas devem passar por um período de maturação final, onde adquirem a capacidade para interagir com o complexo *cumulus*-oócito e realizar a fertilização (YANAGIMACHI, 1994).

No trato reprodutivo da fêmea, espermatozóides móveis migram rapidamente do local de deposição do sêmen em direção ao local de fertilização, sendo removidos desta maneira do ambiente do plasma seminal, o qual contém espermatozóides imóveis, fatores de decapitação e ROS originadas de debris celulares e espermatozóides mortos (MORRELL, 2006). Durante este processo, os espermatozóides móveis são selecionados e passam por mudanças fisiológicas denominadas de capacitação (AUSTIN, 1951), consideradas fundamentais para promover a competência funcional do espermatozóide, como a reação do acrossoma (KOPF, 1999). A capacitação espermática é essencial para a fertilização, não apenas *in vivo*, mas também *in vitro*, e fundamenta a manipulação de espermatozóides visando sua utilização na FIV (MORTIMER, 2000).

A introdução de TRA durante a década de 80, especialmente da FIV, promoveu o desenvolvimento de vários métodos de preparação espermática. Geralmente existem quatro abordagens básicas para separação de espermatozóides do meio de suspensão (plasma seminal ou diluidor): diluição e lavagem (centrifugação e ressuspensão); fracionamento seletivo de subpopulações (centrifugação em gradiente de densidade); aderência (filtração diferencial em lâ de vidro, esferas de vidro ou esferas de polissacarídeos); e técnicas de migração própria (*Swim-up*) (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1997).

Além da FIV, a seleção de espermatozóides é rotineiramente aplicada em outras TRA, tais como: criopreservação (SIEME et al., 2003; ALLAMANENI et al., 2005; MORRELL et

at., 2005; MAXWELL et al., 2007), inseminação artificial (IA) (ZHANG et al., 1998; GRASA et al., 2004; de GRAAF et al., 2007), sexagem (O'BRIEN et al., 2003; HOLLINSHEAD et al., 2004) e injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) (JÍMENEZ-MACEDO et al., 2005).

Nas últimas décadas, trabalhos realizados em várias clínicas do mundo têm observado que a preparação de espermatozóides em gradiente de densidade, associado ao método *Swim-up*, pode remover infectividade viral de amostras de sêmen humano proveniente de doadores infectados com HIV, hepatite C ou hepatite B (ENGLERT et al., 2004). Recentes estudos têm demonstrado que vírus presentes em amostras de sêmen animal podem ser removidos de maneira similar, como por exemplo, o vírus da arterite equina presente no sêmen de garanhões, destacando, assim, a importância dos métodos de preparação espermática para o controle de doenças transmitidas pelo sêmen (GERAGHTY et al., 2004; MORRELL, 2006).

Segundo Henkel e Schill (2003), o método de preparação espermática ideal deve: 1) ser rápido, fácil e ter melhor custo/benefício; 2) isolar o maior número de espermatozóides móveis possível; 3) não causar danos ou alterações nas células espermáticas; 4) retirar espermatozóides mortos e outras células, incluindo leucócitos e bactérias; 5) eliminar substâncias tóxicas ou bioativas como fatores de decapacitação ou ROS; e 6) permitir o processamento de grandes volumes de ejaculados.

2.1.1 *Swim-up*

A metodologia do *Swim-up* utiliza a mobilidade das células espermáticas como método de seleção. Sob condições fisiológicas, apenas espermatozóides com boa motilidade completam a migração através dos fluidos da cérvix e do oviduto (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1997).

Parrish et al. (1986) modificaram o método de Lopata et al. (1976) para bovinos, colocando 250 μ L de uma amostra de células espermáticas sob 1 mL de meio TALP (Tyrode's albumina lactato e piruvato), em quatro tubos plásticos de 12 x 55 mm. Após uma hora de incubação a 39 °C, 850 μ L da camada superior de cada tubo, contendo os espermatozóides móveis, foi retirado e centrifugado a 200 x g, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido e equilibrado em 1mL de meio TALP por 5 minutos a 22 °C. Em seguida, acrescentou-se 3 mL de meio e procedeu-se nova centrifugação. O *pellet* foi ressuspendido em meio TALP a uma determinada concentração.

Os autores determinaram aumento nas taxas de fertilização após utilização da preparação espermática com *Swim-up*.

Uma desvantagem do método *Swim-up* é a grande perda de células espermáticas. O uso da habilidade de migração dos espermatozóides neste procedimento resulta em amostras contendo espermatozóides móveis, mas apresentam rendimento de, aproximadamente, 10-20% para sêmen *in natura* ou <10% da amostra original em amostras de sêmen congelado-descongelado (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1997). Tem sido relatado que a concentração total, bem como a concentração de espermatozóides móveis após *Swim-up*, está relacionada com a fertilidade de bovinos após IA (ZHANG et al., 1998).

Utilizando sêmen criopreservado de bovinos, Parrish et al. (1995) obtiveram com o método *Swim-up* taxa de recuperação de células espermáticas móveis 4,6 vezes menor do que com o método Percoll[®]. Entretanto, observou-se aumento nas taxas de clivagem com diferença na habilidade dos espermatozóides penetrarem oócitos *in vitro* após preparação pelo procedimento *Swim-up*. Palomo et al. (1999), utilizando sêmen *in natura* diluído de caprinos, observaram maior viabilidade espermática após preparação com *Swim-up*, quando comparado com o gradiente Percoll[®]. Contudo, o uso deste procedimento como método de preparação espermática não refletiu em aumento nas taxas de penetração e clivagem de embriões de cabras pré-púberes.

A porcentagem de espermatozóides bovinos mortos, com acrossoma danificado ou sem acrossoma foi maior após a utilização do procedimento *Swim-up* do que após o uso do Percoll[®] (SOMFAI et al., 2002). Adicionalmente, Nevo e Mohan (1969) e Correa e Zavos (1996) trabalhando com sêmen bovino, relataram a morte de alguns espermatozóides que migraram para a fração recuperada, sugerindo que ocorre estresse relacionado ao procedimento durante *Swim-up*, determinando taxa elevada de mortalidade espermática.

Além disso, Correa e Zavos (1996) constataram que a porcentagem de espermatozóides intactos recuperados a partir de vários métodos de preparação foi menor do que a porcentagem de espermatozóides móveis. Desta forma, há evidências de que espermatozóides com anomalias primárias possuem motilidade suficiente para participarem do processo *Swim-up* e, portanto, podem estar presentes na fração recuperada, sem evidências de poderem participar da FIV.

2.1.2 Centrifugação em gradiente de densidade

A centrifugação em gradiente de densidade descontínuo é uma técnica usada para separar alguns diferentes tipos de células. Esta técnica baseia-se no princípio de que sob centrifugação em gradiente de densidade coloidal, as células podem se mover para o local no gradiente correspondente à sua própria densidade, chamado de ponto *isopícnico* (MORTIMER, 1994). Os espermatozóides possuem densidade diferente das células epiteliais, leucócitos, bactérias e debris celulares, e, portanto, podem ser separados de outros componentes do ejaculado. O plasma seminal permanece na região superior do gradiente. Como os espermatozóides móveis podem se orientar na direção da força centrífuga e formar um *pellet* mais rápido do que os imóveis, a seleção cuidadosa do tempo de centrifugação e da velocidade permite a separação das duas subpopulações espermáticas (MORRELL, 2006).

Espermatozóides imaturos, senescentes e com DNA danificado também são retidos nas camadas superiores do gradiente ou na interface, deixando a subpopulação de espermatozóides móveis e potencialmente férteis no *pellet* (SAKKAS et al., 2000). Espermatozóides com defeitos no DNA competem com espermatozóides normais para a fertilização e devem ser removidos a partir da preparação espermática para evitar perdas embrionárias precoces (AHMADI e NG, 1999). A proporção de espermatozóides com DNA intacto está relacionada com o porcentual de clivagem *in vitro* dos embriões (FILATOV et al., 1999), assim como de prenhez em pacientes humanos submetidos à TRA (TOMLINSON et al., 2001).

Uma ampla variedade de métodos usando o princípio da centrifugação em gradiente de densidade para fracionar subpopulações de espermatozóides tem sido descrito na literatura. O Ficoll, inicialmente utilizado para preparação espermática (HARISON, 1976), tem sido atualmente usado para separação de espermatozóides de caprinos (PALOMO et al., 1999). Todavia, a substância mais amplamente utilizada para todos os métodos de reprodução assistida é o Percoll[®], um meio bem documentado para a centrifugação em gradiente de densidade de células, vírus e partículas subcelulares para propósito de pesquisas. Este é composto de partículas de sílica coloidal (15-30 nm de diâmetro), cobertas com polivinilpirrolidona (PVP) não dialisáveis, o que torna as esferas não tóxicas (PERTOFT et al., 2000).

O gradiente de densidade Percoll[®] separa espermatozóides de partículas do diluidor, células e bactérias, bem como gametas que apresentem defeitos de cauda e peça intermediária.

No entanto, na população espermática selecionada por este método um porcentual pequeno destes gametas ainda pode apresentar estes tipos de patologias (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1997).

A capacidade fertilizante dos espermatozóides tem sido avaliada pela técnica de FIV em humanos (AITKEN e CLARKSON, 1988), bovinos (PARRISH et al., 1995; SEIDEL et al., 1995), equinos (ARNS e SHEPHERD, 1994), suínos (GRANT et al., 1994), ovinos (STOJANOV et al., 1994) e caprinos (PALOMO et al., 1999).

Estudos em ovinos (VALCÁRCEL et al., 1996) revelaram que a técnica de gradiente de densidade com Percoll[®] foi capaz de, seletivamente, recuperar espermatozóides móveis, bem como aqueles com membranas plasmática e acrossomal intactas, apenas em amostras de sêmen *in natura* astenospérmicas e em amostras de sêmen descongelado, não havendo melhora significativa quando se utilizou amostras *in natura* normospérmica. Rodríguez-Martínez et al. (1997) estabeleceram que o gradiente Percoll[®] foi particularmente benéfico para amostras de sêmen de bovinos contendo espermatozóides com baixa motilidade (30%) após a descongelação.

Seidel et al. (1995) e Dode et al. (2002) relataram não haver diferenças na qualidade dos espermatozóides separados pelos métodos Percoll[®] ou *Swim-up*, assim como nas taxas de clivagem e no porcentual de blastocistos bovinos. Em contraste, Rho et al. (2001) observaram taxas de clivagem e produção de embriões caprino *in vitro* significativamente maior para amostras que utilizaram Percoll[®], quando comparadas às amostras com *Swim-up*. Cesari et al. (2006) relataram não haver diferença significativa nas taxas de clivagens avaliadas às 72 horas após inseminação *in vitro*, porém maior desenvolvimento de embriões bovinos foi observado no grupo tratado com Percoll[®], quando comparado ao do *Swim-up*.

Em outubro de 1996, o Percoll[®] foi retirado do mercado para utilização em procedimentos de TRA em humanos (CHEN e BONGSO, 1999), em virtude dos riscos de contaminação com endotoxinas (ANDERSEN e GRINSTED, 1997), de possíveis alterações na membrana (STREHLER et al., 1998) e de respostas inflamatórias induzidas pela inseminação com população espermática contaminada por Percoll[®]. Além disso, o Percoll[®] adere à membrana espermática (PICKERING et al., 1989) e pode alterá-la através da remoção dos envelopes de cobertura (TANPHAICHITR et al., 1988). Tem sido relatado que partidas de Percoll[®] diferem na composição, podendo afetar as taxas de clivagem e o desenvolvimento embrionário na FIV de bovinos (AVERY e GREVE, 1995). Assim, foram recomendadas intensivas lavagens dos espermatozóides após separação espermática com Percoll[®] (KEEFER

e PAPROCKI, 1995), requerendo centrifugação adicional, a qual é deletéria aos espermatozóides em virtude da ação maléfica das ROS (AITKEN e CLARKSON, 1988).

Vários produtos foram introduzidos no mercado em meados dos anos noventa visando substituir o Percoll[®], entre os mais comumente usados em TRA na espécie humana encontram-se IxaPrep[®], SilSelect[®], PureSperm[®] ou Isolate[®]. Ao contrário do Percoll[®], que consiste em uma sílica coberta por PVP que pode determinar efeitos deletérios às membranas espermáticas (ARCIDIACONO et al., 1983), estes produtos contêm partículas de sílica cobertas de silano, ajustados para a osmolaridade com polisucrose, com baixa toxicidade.

Rodríguez-Martínez et al. (1997) relataram a primeira aplicação da centrifugação em gradiente de densidade com sílica glicerolpropilsilano, para o isolamento de espermatozóides com melhor motilidade e proporção de membranas intactas, a partir de sêmen criopreservado de bovinos. Mendes Jr et al. (2003) publicaram a primeira tentativa de usar a centrifugação utilizando o gradiente PureSperm[®], objetivando separar espermatozóides criopreservados de bovinos para serem utilizados na FIV. Os autores não constataram diferenças nas taxas de clivagem ou produção de embriões ao compararem os gradientes Percoll[®] e PureSperm[®], onde concluíram que o PureSperm[®] pode ser uma alternativa viável na substituição ao Percoll[®] para preparação de amostras de sêmen criopreservado de bovinos.

O gradiente PureSperm[®] também vem sendo utilizado para preparação de amostras de sêmen criopreservado de carneiros e bovinos visando sua utilização no procedimento de sexagem de espermatozóides por citometria de fluxo e criopreservação (O'BIERN et al., 2003; HOLLINSHEAD et al., 2004; MAXWELL et al., 2007). Espermatozóides criopreservados de carneiros preparados por PureSperm[®] foram subsequentemente sexados, re-congelados e descongelados, e, em seguida, utilizados *in vitro* para produzir embriões ovinos de sexo pré-determinado, resultando no nascimento de cordeiros após a transferência para ovelhas receptoras (HOLLINSHEAD et al., 2004). Nascimento de cordeiros normais também foi obtido após IA de ovelhas com sêmen criopreservado, o qual havia sido sexado após centrifugação em gradiente PureSperm[®] e, subsequentemente, re-congelados e descongelados (de GRAAF et al., 2007).

Embora o Percoll[®] tenha sido retirado do mercado para uso na FIV em humanos, ainda é o produto mais usado na reprodução assistida de animais domésticos. No entanto, recentemente foram lançados no mercado produtos substitutos para o Percoll[®], específicos para os animais domésticos, como BoviPure[®], EquiPure[®] e PorciPure[®] (MORRELL, 2006).

Samardzija et al. (2006a) examinaram os efeitos do BoviPure[®], produto de purificação e preparação de sêmen formulado especificamente para uso com sêmen de bovinos, e Percoll[®] para a preparação de amostras de sêmen de bovinos visando a produção *in vitro* (PIV) de embriões. Os autores não estabeleceram diferenças significativas, considerando os parâmetros espermáticos avaliados entre os métodos. Contudo, a taxa de clivagem e blastocistos foram significativamente maiores para o grupo BoviPure[®]. Quando comparado ao método *Swim-up*, a preparação por centrifugação em gradiente BoviPure[®] mostrou ter maior capacidade de seleção de espermatozóides para PIV de embriões bovinos, concluindo-se que o BoviPure[®] pode ser considerada uma alternativa melhor do que o método *Swim-up* para preparação de espermatozóides criopreservados de bovinos (SAMARDZIJA et al., 2006b).

2.2 Efeito da criopreservação do sêmen nas células espermáticas

A criopreservação de sêmen mamífero é um processo complexo que envolve o equilíbrio de alguns fatores com o intuito de obter resultados satisfatórios. O processo de criopreservação reduz a capacidade fertilizante dos espermatozóides, quando comparada ao sêmen fresco, devido à menor viabilidade pós-descongelamento e a disfunções subletais em uma subpopulação sobrevivente deste gameta (HOLT, 2000).

Há numerosos processos envolvidos na congelamento e descongelamento de espermatozóides, os quais são potencialmente danosos. Injúrias criogênicas ao espermatozóide podem ocorrer em qualquer estágio durante o processo de congelamento/descongelamento, porém os maiores danos não ocorrem no armazenamento a -196 °C, mas principalmente na curva de refrigeração até as temperaturas abaixo de zero grau e no reaquecimento a temperaturas ambientais (WATSON, 1995). Além disso, certas organelas e estruturas internas do espermatozóide podem responder diferentemente a diversos aspectos do processo de congelamento. Portanto, procedimentos de criopreservação adequados devem preservar a integridade da estrutura espermática com diferentes requerimentos criobiológicos na maior proporção da célula (WATSON, 2000).

Considerando os processos de congelamento e descongelamento, os danos criogênicos podem ser morfológicos ou bioquímicos. Mudanças volumétricas (DEVIREDDY et al., 2002), oxidação dos lipídios de membrana espermática (BROUWERS et al., 2005) e danos aos mecanismos de permeabilidade seletiva da membrana são os mais importantes fatores de estresse na congelamento (PESCH e BERGMANN, 2006).

A membrana plasmática e a membrana acrossomal são as regiões mais sensíveis do espermatozóide. Características de capacitação espermática, modificações da estrutura da cromatina como consequência da desnaturação do DNA e alterações na bainha mitocondrial são observadas após congelação/descongelação em várias espécies (GILLAN e MAXWELL, 1999).

Após a congelação/descongelação, 40-60% dos espermatozóides caprinos preservam sua motilidade (LEBOEUF et al., 2000). Entretanto, desta população de gametas móveis, uma proporção sofre mudanças que aumentam a maturação das membranas espermáticas e são acometidas por injúrias mitocondriais que prejudicam o transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea (GILLAN e MAXWELL, 1999; MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006). Estas mudanças contribuem para a baixa fertilidade de espermatozóides caprinos criopreservados utilizados em reprodução assistida quando comparado a espermatozóides *in natura*.

2.3 Uso de sondas fluorescentes para avaliação espermática

O desenvolvimento da tecnologia de coloração com utilização de sondas fluorescentes para enzimas intracitoplasmáticas, lecitinas ou potencial de membrana proporcionam novas ferramentas para avaliação da integridade de alguns componentes celulares (membrana, cromatina) ou do *status* funcional de organelas espermáticas (acrossoma, mitocôndria) (GRAHAM, 2001; SILVA e GADELLA, 2006).

2.3.1 Avaliação da membrana plasmática

A integridade da membrana e a estabilidade de seu aspecto semipermeável são pré-requisitos para a viabilidade do espermatozóide. Além disso, estando a membrana plasmática intacta, mas funcionalmente instável, o espermatozóide não é capaz de interagir com o ambiente e, desta maneira, é incapaz de fertilizar (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2007). A integridade de membrana é usualmente avaliada após a exposição dos espermatozóides a corantes impermeáveis à membrana, de maneira que aqueles gametas que não se coram são considerados vivos. Hoje, muitos corantes usados são fluoróforos que reagem com enzimas citoplasmáticas ou se ligam ao DNA (SILVA e GADELLA, 2006).

Várias sondas fluorescentes têm sido usadas e validadas para análise da integridade de membrana em sêmen de caprinos: diacetato de carboxifluoresceína (DCF) em combinação

com iodeto de propídio (IP) (COLETO et al., 2002); SYBR-14[®] em combinação com IP (PETERSON et al., 2007) e Hoescht 33258 (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006). Coletto et al. (2002), utilizando o DCF em combinação com o IP para avaliação da viabilidade espermática de doses de sêmen descongeladas de reprodutores caprinos da raça Pardo Alpina, determinaram pequena correlação entre a técnica de fluorescência e a motilidade e o vigor espermáticos ($r = 0,1403$), mas relataram que tais corantes são eficientes para avaliar a integridade da membrana plasmática desta espécie.

Recentemente, Peterson et al. (2007), usando a combinação de sondas fluorescentes (SYBR-14[®]/IP) presentes em um kit comercialmente vendido como LIVE/DEAD, na avaliação de sêmen de caprinos da raça Saanen, concluíram existir correlação entre a proporção de células com membranas intactas e a quantidade de espermatozóides móveis armazenados a 18 e 4 °C ($r = 0,77$ e $0,98$, respectivamente). Além disso, evidenciaram que a porcentagem de espermatozóides vivos apresentou correlação com a taxa média de partos ($r = 0,44$ a 18 °C e $r = 0,27$ a 4 °C).

2.3.2 Avaliação da membrana acrossomal

A reação acrossomal é um pré-requisito para que a penetração do espermatozóide ao oócito seja bem sucedida. Por meio da fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática, o espermatozóide libera seu conteúdo enzimático acrossomal por exocitose, permitindo que este penetre na zona pelúcida (FLESCH e GADELLA, 2000).

A integridade acrossomal pode ser mensurada por meio de diferentes métodos, todavia os mais usados são aqueles que utilizam isotiocianato de fluoresceína conjugadas a lecitinas, tais como: *Peanut Agglutinin* (FITC-PNA) ou *Pisum Sativum Agglutinin* (FITC-PSA) (SZASZ et al., 2000; HERRERA et al., 2002). Estas lecitinas ligam-se especificamente a conteúdos acrossomais através da interação com glicoconjugados da membrana acrossomal externa (FITC-PNA) ou com grupos sacarídeos da glicoproteína pro-acrosina (FITC-PSA) (GILLAN et al., 2005; SILVA e GADELLA, 2006).

Recentemente o uso do FITC-PNA foi validado para análise da integridade acrossomal em amostras de sêmen caprino submetidas a processos de preservação e armazenamento, refrigeração ou congelamento (ABOAGLA e TERADA, 2003; MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006; PETERSON et al., 2007), mostrando ainda similaridade à avaliação realizada com o FITC-PSA (ABOAGLA e TERADA, 2004).

2.3.3 Avaliação da função mitocondrial

A mitocôndria provê a maior parte do ATP necessário ao metabolismo total do espermatozóide, incluindo aquele necessário à motilidade. Diferentes sondas fluorescentes têm sido utilizadas para avaliar a função mitocondrial espermática. As sondas mitocondriais são ativamente transportadas nas mitocôndrias com a respiração ativa. Portanto, quanto mais ativa for a respiração mitocondrial mais corante é acumulado nesta organela (GRAHAN e MOCÉ, 2005).

Os fluorocromos Rodamina 123 (R123) e MitoTracker™ (MITO) têm sido usados para avaliar a função mitocondrial do espermatozóide (GARNER et al., 1997; GADELLA e HARRISON, 2002), e são transportados nas mitocôndrias com respiração ativa, mas o acúmulo destas substâncias determina a ocorrência da coloração verde fluorescente. Assim, todas as mitocôndrias funcionais coram-se em verde com R123 e MITO e, conseqüentemente, não há distinção entre as diferentes taxas respiratórias exibidas pelos espermatozoides (GILLAN et al., 2005; SILVA e GADELLA, 2006). No entanto, o JC-1 também é utilizado para avaliar a função mitocondrial dos espermatozoides (THOMAS et al., 1998) e, em baixas concentrações, permanece no seu estado monomérico e fluoresce verde. Entretanto, em altas concentrações o JC-1 forma agregados que fluoresce em laranja. Portanto, o JC-1 não apenas tem a habilidade para distinguir a mitocôndria funcional daquela não funcional, mas permite que os diferentes níveis de função mitocondrial sejam observados pela intensidade da cor laranja apresentada na mitocôndria (GRAHAN e MOCÉ, 2005).

Hemachand e Shaha (2003), trabalhando com espermatozoides ejaculados e oriundos do epidídimo de caprinos submetidos a estresse oxidativo, relataram haver relação entre o padrão de coloração com o JC-1 e a motilidade. Por outro lado, Marco-Jiménez et al. (2006) mostraram que o processo de congelação/descongelação de sêmen de caprinos da raça Murciano-granadina determina considerável diminuição no número de células com alto potencial mitocondrial (59,0% vs 27,7%).

2.3.4 Avaliação da estrutura da cromatina

A avaliação do grau de integridade do DNA é considerada importante em virtude do desenvolvimento embrionário inicial depender da presença de DNA normal (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Vários métodos podem ser utilizados para determinar danos ao DNA,

incluindo análise Cometa, TUNEL, o teste que utiliza as propriedades meta cromáticas da Laranja de Acridina (SILVA e GADELLA, 2006) ou a avaliação por citometria de fluxo do grau de desnaturação do DNA, conhecido como *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA) (EVENSON e WIXON, 2006). Souza et al. (2008), utilizando a técnica de coloração com Laranja de Acridina, constataram porcentual reduzido de espermatozóides caprinos com danos no DNA, corroborando com os relatos de Ahmad et al. (2008), ao descreverem a ocorrência de poucos danos ao DNA espermático após congelação/descongelação de amostras de sêmen caprino, não evidenciando diferença significativa com as amostras de sêmen *in natura*. Segundo estes autores, este resultado pode ser decorrente do fato de espermatozóides caprinos, assim como os de bovinos, possuírem configuração nuclear mais estável do que em outras espécies, tais como suína.

REFERÊNCIAS

ABOAGLA, E.M.; TERADA, T. Trehalose enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1245-1250, 2003.

ABOAGLA, E.M.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1160-1172, 2004.

AHMAD, M.Z.A.A. et al. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 43, p. 429-436, 2008.

AHMADI, A.; NG, S-C. Fertilizing ability of DNA-damaged sperm. **Journal of Experimental Zoology**, v. 284, p. 696-704, 1999.

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 367-376, 1988.

ALLAMANENI, S.S.R. et al. Comparative study on density gradients and *Swim-up* preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa. **Asian Journal of Andrology**, v. 7, p. 86-82, 2005.

ANDERSEN, C.Y.; GRINSTED, J. A new method for the purification of human motile spermatozoa applying density-gradient centrifugation: Polysucrose media compared to Percoll media. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 14, p. 624-624, 1997.

ARCIDIACONO, A. et al. The use of Percoll gradients for preparation of subpopulations of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 6, p. 433-445, 1983.

ARNS, M.J.; SHEPHERD, R.E. Percoll gradient selection of equine spermatozoa enhances ability to bind and penetrate the zone pellucida. **Theriogenology**, v. 41, p. 158, 1994.

- AUSTIN, C.R. Observation of the penetration of sperm into the mammalian egg. **Australian Journal Research**, v. 4, p. 581-596, 1951.
- AVERY, B.; GREVE, T. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. **Theriogenology**, v. 44, p. 871-878, 1995.
- BALDASSARRE, H. et al. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. **Theriogenology**, v. 57, p. 275-284, 2002.
- BROUWERS, J.F.; SILVA, P.F.; GADELLA, B.M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. **Theriogenology**, v. 63, p. 458-469, 2005.
- CESARI, A. et al. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. **Theriogenology**, v. 66, p. 1185-1193, 2006.
- CHEN, M.J.; BONGSO, A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. **Human Reproduction**, v. 14, p. 759-764, 1999.
- COGNIÉ, Y. et al. Current status of embryos technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v. 59, p. 171-188, 2003.
- COGNIÉ, Y. et al. State-of-the-art production, conservation and transfer of in-vitro-produced embryos in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 437-445, 2004.
- COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 101-104, 2002.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. **Theriogenology**, v. 46, p. 1225-1232, 1996.

De GRAAF, S.P. et al. Birth of offspring of pre-determined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, p. 391-398, 2007.

DEVIREDDY, R.V. et al. Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. **Reproduction**, v. 124, p. 643-648, 2002.

DODE, M.A.N. et al. The effects of sperm preparation and co-incubation time in vitro fertilization of bos indicus oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 15-23, 2002.

ENGLERT, Y. et al. Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral disease. **Human Reproduction Update**, v. 10, p. 149-162, 2004.

EVENSON, D.P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v. 65, p. 979-991, 2006.

FILATOV, M.V. et al. Relationship between abnormal sperm chromatin packaging and IVF results. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, p. 825-830, 1999.

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

GADELLA, B.M.; HARRISON, R.A. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate dependent, but apoptosis unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 340-350, 2002.

- GARNER, D.L. et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.
- GERAGHTY, R.J. et al. Removal of equine arteritis virus from stallion semen. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 195, 2004.
- GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.C. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 271-283, 1999, Supplement.
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.
- GONZALEZ, C.I.M.; SOARES, A.T.; CUNHA, M.G.G. Incremento da produção de caprinos das raças British Alpine e Bôer por meio da utilização da transferência de embriões pela via transcervical. In: **Relatório Técnico Final** - Projeto Financiado pelo BNB, p. 1-35, 2001.
- GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247, 2001.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 492-504, 2005.
- GRANT, S.A.; LONG, S.E.; PARKINSON, T.J. Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 477-483, 1994.
- GRASA, P. et al. Ram sperm selection by a dextran/*Swim-up* procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 982-990, 2004.
- HARISON, R.A.P. A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 48, p. 347-353, 1976.

HEMACHAND, T.; SHAHA, C. Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 538, p. 14-18, 2003.

HENKEL, R.R.; SCHILL, W.B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 108, 2003.

HERRERA, J. et al. Acrosome reaction infertile and subfertile boar sperm. **Archives of Andrology**, v. 48, p. 133-139, 2002.

HOLLINSHEAD, F.K. et al. Birth of lambs of a pre-determined sex after *in vitro* production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p. 557-568, 2004.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

JIMENEZ-MACEDO, A.R. et al. Comparison between intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization employing oocytes derived from prepubertal goats. **Theriogenology**, v. 64, p. 1249-1262, 2005.

KEEFER, C.L.; PAPROCKI, A.M. Effect of Percoll following sperm separation on *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 43, p. 244, 1995.

KOPF, G.S. Acrosome reaction. **Encyclopedia of Reproduction**, v. 1, p. 17-25, 1999.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.

LOPATA, A. et al. A method for collecting motile spermatozoa from human semen. **Fertility and Sterility**, v. 27, p. 677-684, 1976.

MARCO-JIMÉNEZ, F. et al. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. **Cryobiology**, v. 52, p. 295-304, 2006.

MAXWELL, W.M.C. et al. Retained functional integrity of bull spermatozoa after double freezing and thawing using PureSperm[®] density gradient centrifugation. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 42, p. 489-494, 2007.

MENDES Jr, J.O.B. et al. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, v. 60, p. 331-340, 2003.

MORRELL, J.M. Update on semen technologies for animal breeding. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 41, p. 63-67, 2006.

MORRELL, J.M. et al. Effect of semen extender and density gradient centrifugation on the motility and fertility of turkey spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 40, p. 522-525, 2005.

MORTIMER, D. Practical Laboratory Andrology. Oxford: **Oxford University Press**, 1994. 393p.

MORTIMER, D. Sperm preparation methods. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 357-366, 2000.

NEVO, A.C.; MOHAN, R. Migration of motile spermatozoa into sperm-free medium and the 'dilution effect'. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, p. 379-381, 1969.

O'BIEN, J.K. et al. Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in sheep and non-human primates. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p. 367-375, 2003.

PALOMO, M.J. et al. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 51, p. 927-940, 1999.

PARRISH, J.J. et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, p. 591-600, 1986.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either *Swim-up* or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-869, 1995.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. **Journal Biochemical and Biophysical Methods**, v. 44, p. 1-30, 2000.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and criopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597-612, 2006.

PETERSON, K. et al. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. **Theriogenology**, v. 67, p. 863-871, 2007.

PICKENING, S.J. et al. Are human spermatozoa separated on a Percoll density gradient safe for therapeutic use? **Fertility and Sterility**, v. 51, p. 1024-1029, 1989.

RHO, G.J.; HAHNEL, A.C.; BETTERIDGE, K.J. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects in the production of goat embryo in vitro. **Theriogenology**, v. 56, p. 503-516, 2001.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean up. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 297-308, 1997.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. State of the art farm animal sperm evaluation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 91-101, 2007.

SAKKAS, D. et al. The use of two density centrifugation techniques and the *Swim-up* method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1112-1116, 2000.

SAMARDZIJA, M. et al. A comparison of BoviPure[®] and Percoll[®] on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 237-247, 2006a.

SAMARDZIJA, M. et al. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, doi: 10.1186/1477-7827-4-58, 2006b.

SEIDEL, G.E.; LEIPOLD, S.D.; SHAWKI, H. Preparation of bovine sperm for *in vitro* fertilization by *Swim-up* or centrifugation through Percoll or BSA. **Theriogenology**, v. 43, p. 319, 1995.

SIEME, H. et al. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 38, p. 134-140, 2003.

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

SIMPLÍCIO, A.A. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos em regiões tropicais semi-áridas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS: RAÇAS NATIVAS PARA O SEMI-ÁRIDO, 1, Recife, 2004, **Anais...** p. 117-137, 2004.

SOMFAI, T. et al. Effect of *Swim-up* and Percoll treatment on viability and acrossome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 37, p. 285-290, 2002.

SOUZA, A.F. et al. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. **Ciência Rural**, 2008, No prelo.

STOJANOV, T. et al. In vitro fertilization with chilled-stored ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 41, p. 302, 1994.

STREHLER, E. et al. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (Notulae Seminologicae 13). **Human Reproduction**, v. 13, p. 120-123, 1998.

SZASZ, F. et al. Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 289-298, 2000.

TANPHAICHITR, N. et al. Egg-penetration ability and structural properties of human sperm prepared by Percoll gradient centrifugation. **Gamete Research**, v. 20, p. 67-81, 1988.

THOMAS, C.A. et al. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 786-793, 1998.

TOMLINSON, M.J. et al. Sperm morphology and nuclear DNA integrity after density gradient centrifugation (DGC) through PureSperm, relationship to IVF outcome. **Journal of Andrology**, p. P3/4-100, 2001, Supplement 1.

VALCÁRCEL, A. et al. Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 215-224, 1996.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of the reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

YANAGIMACH, R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, Eds. **The Physiology of Reproduction**, 2nd Ed., New York, Raven Press, 1994, p. 189-317.

ZHANG, B.R. et al. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bull. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 207-216, 1998.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

4.1 Viabilidade espermática após utilização dos métodos *Swim-up* ou gradiente de densidade (Percoll[®] e CapriPure[®]) em amostras criopreservadas de sêmen caprino

Sperm viability after use of Swim-up or density gradient methods (Percoll[®] and CapriPure[®]) on cryopreserved samples of goat semen

BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; WISCHRAL, A.; GUERRA, M.M.P.

Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE.

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE.

Resumo

Visando estudar a viabilidade espermática após utilização dos métodos *Swim-up* ou gradiente de densidade (Percoll[®] e CapriPure[®]) em amostras criopreservadas de sêmen caprino para uso em reprodução assistida, foram colhidas amostras de sêmen de seis reprodutores Boer. A seguir, as amostras foram avaliadas (concentração, motilidade progressiva e morfologia), submetidas a duas lavagens em solução Tris, diluídas, envasadas em palhetas (0,25 mL), criopreservadas em máquina e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C). Após descongelação (37 °C; 30 segundos), procedeu-se à formação do *pool* das amostras dos reprodutores e a seguir, avaliação dos parâmetros espermáticos (motilidade progressiva, integridade de membrana e do acrossoma, e potencial de membrana mitocondrial). Em seguida, o *pool* foi dividido em duas alíquotas para seleção espermática utilizando os métodos *Swim-up* e Percoll[®] (Experimento 1) e centrifugação em gradiente de densidade Percoll[®] e CapriPure[®] (Experimento 2). Após seleção, procederam-se às análises dos parâmetros espermáticos. No Exp. 1 foram constatados menores percentuais de espermatozoides portadores de motilidade progressiva ($P < 0,05$) e de espermatozoides com membranas intactas ($P < 0,01$) após utilização do método *Swim-up*, quando comparado às amostras submetidas à preparação espermática com Percoll[®]. No Exp. 2, não se constatou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os gradientes de densidade, Percoll[®] e CapriPure[®], em todos os parâmetros espermáticos. Conclui-se que, para selecionar espermatozoides viáveis de amostras congeladas de sêmen caprino, deve-se usar a centrifugação em gradiente de densidade, e que o CapriPure[®] é uma boa alternativa ao uso do Percoll[®].

Palavras-chave: Preparação espermática, *Swim-up*, Percoll[®], CapriPure[®], caprino.

Abstract

Aiming to study the sperm viability after use of *Swim-up* or density gradient methods (Percoll[®] and CapriPure[®]) in frozen-thawed goat semen samples for use in assisted reproduction, semen samples from six Boer goats were collected. Following, the samples were evaluated for concentration, progressive motility and morphology, diluted, packaged in

straws (0.25 mL), frozen using machine and stored in liquid nitrogen. After thawing (37 °C for 30 s), sperm from all six goats were mixed-up making a pool and then evaluated for progressive motility, membrane integrity, acrossomal integrity and mitochondrial membrane potential. After that, the *pool* was split into two aliquots for accomplishment of sperm selection using *Swim-up* and Percoll[®] methods (Experiment 1) and centrifugation in Percoll[®] and CapriPure[®] density gradient (Experiment 2). After use of each method of selection, it was proceeded the analyses to progressive motility, membrane integrity, acrossomal integrity and mitochondrial integrity. In the Exp. 1 lower percentage of progressive motility sperm (P<0.05) and intact plasma membrane (P<0.01) after use of the *Swim-up* method were evidenced, when compared with samples submitted to the sperm preparation with Percoll[®]. In the Exp. 2, there were no significant differences (P>0.05) between Percoll[®] and CapriPure[®] density gradient regarding sperm evaluation parameters. It can be concluded that to select viable sperm of frozen goat semen samples should use density gradient methods and CapriPure[®] is a good alternative to Percoll[®].

Keywords: Sperm preparation, *Swim-up*, Percoll[®], CapriPure[®], goat.

1 Introdução

A otimização do uso de tecnologias de reprodução assistida (TRA) requer o desenvolvimento de métodos rápidos, seguros e efetivos de seleção de gametas masculinos funcionais, a partir da remoção de plasma seminal, agentes crioprotetores e debris celulares, assim como do aumento da concentração de espermatozoides viáveis (Rodríguez-Martínez et al., 1997).

Vários métodos de seleção espermática têm sido descritos e utilizados rotineiramente nos procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV) em humanos e bovinos, tais como lavagem e centrifugação (Fukuda et al., 1990), centrifugação em gradiente de densidade (Parrish et al., 1995), filtração em colunas de lã de vidro (Sterzik et al., 1998) e migração espermática (Lonergan et al., 1994). Entretanto, os métodos mais amplamente usados são *Swim-up* e centrifugação em gradiente de densidade Percoll[®] (Rodríguez-Martínez et al., 1997; Palomo et al., 1999).

O Percoll[®] é um meio composto de partículas de sílica coloidal (15-30 nm de diâmetro), cobertas com polivinilpirrolidona (PVP), utilizado para centrifugação em gradiente de densidade de células, vírus e partículas subcelulares, bem como para seleção de espermatozoides (Pertoft, 2000). Vários estudos têm evidenciado maior eficiência do uso do Percoll[®] em preparações espermáticas (Parrish et al., 1995; Rodríguez-Martínez et al., 1997), quando comparada à técnica de lavagem ou *Swim-up* (Correa e Zavos, 1996; Somfai et al., 2002).

Entretanto, o Percoll[®] não tem sido utilizado em TRA na medicina humana, em virtude de seus efeitos tóxicos (Chen e Bongso, 1999) causarem redução das taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário (Mendes Jr et al., 2003). Da mesma forma, em amostras de sêmen caprino, maior viabilidade espermática tem sido observada após utilização do método *Swim-up*, quando comparado ao de centrifugação em gradiente de densidade com Percoll[®], apesar deste procedimento não proporcionar aumento das taxas de penetração dos espermatozoides nos oócitos e clivagem de embriões de cabras pré-púberes após FIV (Palomo et al., 1999).

Em virtude disto, a indústria farmacêutica têm disponibilizado diferentes meios para substituir o gradiente Percoll[®], como por exemplo, o CapriPure[®], composto por solução salina iso-osmótica contendo partículas de sílica cobertas por silano, formulado especificamente para separação de espermatozoides caprinos.

O método utilizado para seleção de espermatozoides criopreservados deve possuir acurácia, visto que a criopreservação afeta algumas características espermáticas como motilidade, atividade respiratória, integridade de membranas e do DNA (Gillan et al., 2004). Na última década, a descoberta de uma variedade de fluorocromos e compostos conjugados a sondas fluorescentes têm possibilitado maior confiabilidade nas análises funcionais dos espermatozoides (Silva e Gadella, 2006). Por conseguinte, visando identificar o método mais eficaz de seleção de espermatozoides caprinos, objetivou-se estudar a viabilidade espermática após utilização dos métodos *Swim-up* ou gradiente de densidade (Percoll[®] e CapriPure[®]) em amostras criopreservadas de sêmen caprino para uso em reprodução assistida.

2 Material e Métodos

A menos que do contrário indicado, todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.1 Origem do sêmen

Foram utilizados seis reprodutores caprinos da raça Boer, com fertilidade comprovada e idade variando de 12 a 36 meses, submetidos a regime intensivo, alimentados com 400g de concentrado comercial, além de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado no cocho, sal mineral e água *ad libitum*. As colheitas de sêmen foram realizadas com vagina artificial e

uma fêmea como manequim. Foram obtidos quatro ejaculados de cada reprodutor, correspondendo a 24 amostras de sêmen.

Após colheita, as amostras de sêmen foram submetidas à avaliação macroscópica (cor, volume e aspecto) e microscópica (motilidade progressiva-MP, concentração e morfologia espermática). Todos os ejaculados apresentaram MP mínima de 80,0%.

2.2 Congelamento e descongelamento do sêmen

As amostras de sêmen *in natura* foram submetidas a duas lavagens em solução Tris (3,605g Tris; 2,024g ácido cítrico; 1,488g frutose, 100mL de água bidestilada; pH 6,8), na proporção de 1:9 (v: v; sêmen: solução de lavagem) e centrifugadas (1200 x g) durante 10 minutos. Após a segunda lavagem, diluente à base de leite em pó desnatado contendo glicerol (7%) foi acrescentado ao sedimento, à temperatura ambiente, para atingir a concentração de $2,4 \times 10^8$ espermatozoides/mL. As amostras de sêmen foram acondicionadas em palhetas (0,25 mL) e congeladas em máquina TK 3000 (TK Tecnologia em congelamento, Uberaba, Brasil), na curva de congelamento rápida (- 0,25 °C/min, de 25 °C a 5 °C, e a - 20 °C/min, de 5 °C a -120 °C) e, após atingir -120 °C, as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (- 196 °C).

Uma palheta (0,25 mL) de cada reprodutor foi descongelada em banho-maria a 37 °C durante 30 segundos e, em seguida, procedida a formação do *pool* de amostras dos seis reprodutores, o qual foi submetido às avaliações dos parâmetros espermáticos (motilidade progressiva, concentração, integridade da membrana plasmática e de acrossoma, e atividade mitocondrial).

2.5 Avaliação espermática

Integridade da membrana plasmática

Utilizou-se o método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e Iodeto de Propídio (IP), conforme descrito por Coletto et al. (2002), modificado. Aliquotas de 50 µL de sêmen foram diluídas em 150 µL de Tris contendo 5 µL de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 µL de IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos a 38 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em

microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), com aumento de 400 x usando filtro de emissão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485/20 nm, e classificados com membrana intacta, quando se apresentavam corados em verde, e com membrana danificada, quando corados em vermelho.

Integridade do acrossoma

Os espermatozoides foram corados com isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA), de acordo com técnica descrita por Roth et al. (1998). Aliquotas de 5 μ L de sêmen foram preparadas para esfregaço e secadas ao ar. Uma alíquota de 100 μ L da solução estoque de FITC-PNA (1 mg/mL) foi descongelada e adicionada a 900 μ L de PBS para obter a concentração final de 100 μ g/mL. Aliquotas (10-20 μ L) desta solução foram colocadas sobre lâminas, as quais foram incubadas por 15 minutos em câmara úmida a 4 °C, na ausência de luz. Após incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS refrigerado (4 °C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 μ L de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de p-phenylenediamine) foi colocado sobre a lâmina e coberto com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000 x, sob óleo de imersão, em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os gametas foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentavam a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou acrossoma reagido, quando apresentavam uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda região da cabeça.

Atividade mitocondrial

A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie e Welch, 2006). Aliquotas de 50 μ L de sêmen foram diluídas em 150 μ L de Tris contendo 5 μ L de JC-1 (0,15 mM em DMSO), incubadas por 10 minutos a 38 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), com aumento de 1000 x sob óleo de imersão usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490

nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

2.6 Seleção espermática

Após as análises, o *pool* das amostras descongeladas de sêmen foi dividido em duas alíquotas, com a finalidade de realizar os procedimentos de seleção espermática utilizando os métodos *Swim-up* e gradiente de densidade Percoll[®] (Experimento 1) ou Percoll[®] e CapriPure[®] (Experimento 2). Cada procedimento foi repetido quatro vezes.

2.6.1 Experimento 1: *Efeito dos métodos Swim-up e centrifugação em gradiente de densidade Percoll[®] sobre a viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino*

Swim-up

Setenta microlitros de sêmen foram colocados no fundo do tubo cônico contendo 2 mL de meio sp-TALP e mantidos à temperatura de 38 °C. Após uma hora, 600 µL do sobrenadante foi removido e centrifugado a 200 x g por 10 minutos (Palomo et al., 1999, com modificações). Este procedimento foi realizado em triplicata.

Gradiente de densidade Percoll[®]

Foi utilizada uma solução isotônica de Percoll[®] 90% (TALP 10x: Percoll[®] - 1:9) suplementada com 80 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 0,29 mM NaH₂PO₄, 1,97 mM CaCl₂, 0,39 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 26 mM ácido lático e 25 mM NaHCO₃. O gradiente Percoll[®] foi preparado, em um tubo de 15 mL, pela adição de 2 mL da solução de Percoll[®] 45% sobre 2 mL da solução Percoll[®] 90%. A seguir, 200 µL de sêmen foram colocados sobre o gradiente Percoll[®] e, em seguida, centrifugado a 700 x g por 15 minutos. O *pellet* foi ressuspensão em 6 mL de sp-TALP e centrifugado a 700 x g por 5 minutos (Parrish et al., 1995).

Nos dois procedimentos, o *pellet* espermático foi ressuspensão em 200 µL de sp-TALP e submetido às avaliações de motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática e

do acrossoma, e potencial de membrana mitocondrial, de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

2.6.2 Experimento 2: *Efeito dos meios Percoll[®] e CapriPure[®] utilizados em gradientes de densidade sobre a viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino*

Gradiente de densidade Percoll[®]

As amostras descongeladas de sêmen submetidas ao método de seleção utilizando o gradiente de densidade Percoll[®] foram processadas conforme descrito no Experimento 1.

Gradiente de densidade CapriPure[®]

O CapriPure[®] (Nidacon Laboratories AB, Göthenborg, Sweden) foi manipulado à temperatura ambiente (25 °C). Em um tubo de centrífuga com tampa (15 mL), foram colocados 2 mL de CapriPure[®] Botton Layer Medium e, a seguir, acrescentou-se 2 mL do meio CapriPure[®] Top Layer Medium. Aliquotas (200 µL) descongeladas de sêmen foram colocadas no topo do gradiente e centrifugadas a 300 x g por 20 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuscitado em 6 mL de sp-TALP, e centrifugado a 500 x g por 10 minutos. A seguir, o *pellet* espermático foi ressuscitado em 200 µL de sp-TALP e submetido às avaliações de viabilidade espermática descritas anteriormente.

2.7 *Análise Estatística*

As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste de análise de variância (ANOVA) após transformação do arc seno ($\sqrt{P/100}$) dos valores percentuais e teste de comparação múltipla de Tukey, utilizando o programa INSTAT para Windows (versão 3.01).

3 Resultados

3.1 Experimento 1

Os resultados das características espermáticas de amostras de sêmen, após descongelamento e seleção pelos métodos *Swim-up* e Percoll[®] estão apresentados na Tabela 1. Foram constatados menores percentuais de espermatozoides portadores de motilidade progressiva ($P < 0,05$) e de membranas intactas ($P < 0,01$; Figura 1), após utilização do método de seleção espermática *Swim-up*, quando comparados àqueles observados nas amostras submetidas à preparação espermática com Percoll[®], as quais não diferiram ($P > 0,05$) dos percentuais observados imediatamente após descongelamento das amostras. Nenhuma diferença significativa ($P > 0,05$) foi observada ao se avaliar os percentuais de espermatozoides portadores de acrossoma íntegro e com alto potencial de membrana mitocondrial, das amostras avaliadas imediatamente após descongelamento e após o uso dos métodos *Swim-up* e Percoll[®].

3.2 Experimento 2

Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os valores de concentração espermática, motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática das amostras de sêmen imediatamente após a descongelamento ou após utilização dos gradientes de densidade Percoll[®] e CapriPure[®] (Tabela 2). Houve redução significativa ($P < 0,05$) no percentual de espermatozoides com acrossomas intactos (Figura 2), após centrifugação em gradiente de Percoll[®], quando comparado ao percentual da amostra imediatamente após a descongelamento, as quais não diferiram ($P > 0,05$) das amostras selecionadas com o gradiente CapriPure[®]. Evidenciou-se diferença significativa nos percentuais de espermatozoides portadores de alto potencial de membrana mitocondrial (Figura 3) das amostras de sêmen submetidas à seleção utilizando os gradientes de densidade Percoll[®] ($P < 0,05$) e CapriPure[®] ($P < 0,01$), quando comparados aos valores das amostras avaliadas imediatamente após a descongelamento. No entanto, nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi observada entre os percentuais de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial das amostras submetidas à seleção utilizando os gradientes de densidade Percoll[®] e CapriPure[®].

4 Discussão

Embora existam numerosos estudos comparando os métodos de separação espermática *Swim-up* e centrifugação em gradiente de densidade Percoll[®], os resultados obtidos ainda são contraditórios, uma vez que alguns autores não observaram diferença entre as características espermáticas após utilização destes métodos (Dode et al., 2002) ou citaram o *Swim-up* (Palomo et al., 1999) ou o gradiente de densidade Percoll[®] como o método que proporciona melhor qualidade espermática (Somfai et al., 2002; Cesari et al., 2006).

Neste estudo, os resultados obtidos no Experimento 1 revelaram não haver melhora nos parâmetros espermáticos após separação pelo método Percoll[®], quando comparados aos valores das amostras avaliadas imediatamente após a descongelação. No entanto, Rho et al. (2001) relataram a habilidade do Percoll[®] em obter frações espermáticas móveis e com membranas plasmática e acrossomal intactas usando sêmen criopreservado de caprinos. Estes autores usaram colunas de 3 mL do gradiente Percoll[®] 45/90%, centrifugação do sêmen a 1000 x g por 15 minutos, e o *pellet* ressuspendido foi lavado duas vezes em 4 mL de sp-SOF por centrifugação a 300 x g por 6 minutos cada vez, provavelmente determinando diferença nos resultados entre os dois experimentos.

Por outro lado, estudos com sêmen de bovinos reportaram que os efeitos benéficos do gradiente Percoll[®] ocorreram apenas em amostras de sêmen criopreservadas contendo espermatozoides com baixa motilidade pós-descongelação (27-30%) (Rodríguez-Martínez et al., 1997), diferindo dos resultados obtidos neste estudo, utilizando sêmen caprino, onde se obteve boa motilidade progressiva pós-descongelação (58,33%).

A menor porcentagem de espermatozoides móveis e com membranas intactas obtidas após uso do método *Swim-up*, em relação ao Percoll[®], difere daquelas observadas por Palomo et al. (1999), onde o procedimento *Swim-up* determinou resultados significativamente melhores do que o Percoll[®]. Esta divergência provavelmente se deve ao fato destes autores terem utilizado sêmen *in natura*, enquanto neste estudo utilizaram-se amostras congeladas/descongeladas, demonstrando a importância da origem do sêmen (*in natura* ou criopreservado) para a escolha do método de seleção.

Existem algumas evidências de que o processamento do sêmen determina estresse aos espermatozoides durante a realização do método *Swim-up*, resultando em elevada taxa de mortalidade dos espermatozoides recuperados (Nevo e Mohan, 1996). Este estresse está provavelmente relacionado ao tempo, relativamente longo, necessário para recuperar

espermatozoides por esta técnica (Correa e Zavos, 1996), demonstrando que o tempo de processamento é de extrema importância, uma vez que a criopreservação e o processo de descongelamento já reduzem a viabilidade e a longevidade destes espermatozoides *in vivo* e *in vitro* (Gillan et al., 2004).

Uma outra hipótese para a redução na porcentagem de espermatozoides móveis e com membrana intacta após utilização do método *Swim-up* é o “efeito diluição”. Salisbury e VanDemark (1978) atribuíram a diminuição do tempo de sobrevivência de espermatozoides bovinos, após diluição elevada do sêmen, ao aumento na tensão de oxigênio e subsequente produção excessiva de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O sêmen *in natura* ou criopreservado de caprino é vulnerável ao “efeito diluição” e a geração excessiva de H_2O_2 está envolvida no início da cascata de peroxidação lipídica na membrana espermática, determinando perda da fluidez, necessária para a manutenção da motilidade e da integridade acrossomal (Khalifa e El-Saidy, 2006).

Em todas as amostras de sêmen analisadas neste estudo (Exp. 1 e 2) observou-se que a porcentagem de espermatozoides com membranas intactas foi inferior à porcentagem de espermatozoides móveis. Sabe-se que a criopreservação determina danos à membrana plasmática e à integridade das organelas por alterar a organização da bicamada lipídica, bem como pela peroxidação dos lipídios de membrana (Silva e Gadella, 2006). Portanto, é possível que neste estudo alguns espermatozoides móveis apresentassem as membranas danificadas pelo processo de congelamento/descongelamento.

Além disso, alguns estudos têm evidenciado os efeitos negativos da centrifugação após uso do método *Swim-up* sobre a viabilidade e a motilidade espermática (Shamsuddin e Rodríguez-Martínez, 1994). Estes resultados indicam mais uma vez que métodos envolvendo estresse mecânico, tais como centrifugação, são prejudiciais à viabilidade de espermatozoides caprinos. Nos métodos *Swim-up* ou gradiente de densidade Percoll[®] são realizados um ou mais procedimentos de centrifugação e, embora o segundo seja mais efetivo do que o primeiro em selecionar espermatozoides viáveis, ambos danificam as membranas celulares e contribuem para a redução do percentual de espermatozoides viáveis. Vale ressaltar, entretanto, que normalmente o sêmen de caprinos é submetido a procedimentos de centrifugação no início do processo de criopreservação, visando retirar o plasma seminal (Souza et al., 2002).

A seleção pelo método *Swim-up* e Percoll[®] não diferiram nos percentuais de gametas com acrossomas íntegros e com alto potencial de membrana mitocondrial. Em contrapartida,

estudos por microscopia eletrônica de transmissão, em sêmen criopreservado de bovino, revelaram elevada porcentagem de espermatozoides com acrossomas parcialmente perdidos após uso do Percoll[®], quando comparada àquela obtida pelo método *Swim-up* (Cesari et al., 2006). No sêmen de ovinos, o gradiente de densidade Percoll[®] determinou elevada porcentagem de espermatozoides capacitados, quando comparados àqueles obtidos pela técnica *Swim-up* ou nas amostras de sêmen *in natura* (Marti et al., 2006).

Embora o Percoll[®] tenha sido retirado do mercado para uso em TRA na medicina humana, este produto ainda é bastante usado na reprodução assistida de animais domésticos. No entanto, recentemente foram lançados no mercado produtos substitutos para o Percoll[®], específicos para os animais domésticos, justificando a realização do Experimento 2, que visou comparar a viabilidade de espermatozoides selecionados pelos métodos de seleção espermática com gradiente de densidade CapriPure[®] e Percoll[®].

Neste experimento, os parâmetros espermáticos das amostras submetidas à seleção pelo método CapriPure[®] mostraram-se similares àquelas submetidas ao Percoll[®]. Em bovinos, o uso de partículas de sílica cobertas com silano (BoviPure[®]) na centrifugação em gradiente de densidade de amostras criopreservadas de sêmen, comparado ao Percoll[®], não resultou em diferenças significativas ($P > 0,05$) na motilidade, concentração, integridade de membrana e de acrossoma (Samardzija et al., 2006).

Também em sêmen criopreservado de bovino, a preparação em gradiente PureSperm[®] não influenciou a motilidade total, mas melhorou significativamente a proporção de espermatozoides com acrossomas intactos. Este gradiente selecionou uma população espermática com melhor motilidade total apenas quando as amostras apresentavam baixa motilidade pós-descongelamento (Maxwell et al., 2007). Os gradientes PureSperm[®] e BoviPure[®] são compostos por uma solução salina iso-osmótica contendo partículas de sílica cobertas com silano, para uso em amostras de sêmen humano e bovino, respectivamente, e diferem pouco do protocolo CapriPure[®]. No entanto, os autores citados recomendaram o uso de PureSperm[®] e BoviPure[®] como alternativas ao gradiente Percoll[®].

A redução significativa no percentual de espermatozoides com acrossomas intactos quando utilizado o gradiente Percoll[®], contraria outros resultados que relataram maior porcentagem de células espermáticas com membrana acrossomal intacta após uso deste gradiente de densidade em amostras criopreservadas de sêmen de caprinos (Rho et al., 2001) e bovinos (Somfai et al., 2002).

O menor porcentual de células com acrossomas intactos observados após preparação com Percoll[®] provavelmente ocorreu devido ao fenômeno de capacitação e reação do acrossoma induzido por este método de seleção. O PVP, presente no Percoll[®], tem efeitos adversos sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides humanos (Strehler et al., 1998). Há relatos de que partidas de Percoll[®] diferem na composição e esta variação pode afetar as taxas de clivagem e o desenvolvimento embrionário (Avery e Greve, 1995), no entanto, durante todo o experimento, o gradiente de densidade foi preparado com Percoll[®] de uma mesma partida.

A força de centrifugação pode afetar a motilidade e a integridade das membranas de espermatozoides ovinos (Gil et al., 1999) e caprinos (Ritar, 1993). Em virtude disto, e por causa das diferentes velocidades de centrifugação utilizadas na técnica de cada gradiente, os resultados dos parâmetros espermáticos obtidos nos dois protocolos devem ser interpretados com atenção.

O *status* mitocondrial desempenha importante papel devido à sua relação com o perfil energético e a motilidade espermática e, conseqüentemente, a fertilidade (Kasai et al., 2002). O processo de congelação/descongelação de espermatozoides obtidos de caprinos da raça Murciano-granadina reduziu consideravelmente o número de células com alto potencial mitocondrial, quando avaliados pela técnica do JC-1 (Marco-Jiménez et al., 2006). No entanto, os resultados do Experimento 1 mostraram que não houve diferença no porcentual de gametas com alto potencial de membrana mitocondrial entre as amostras submetidas a seleção utilizando os métodos *Swim-up* ou Percoll[®]. Enquanto no Experimento 2, foi observado aumento significativo no porcentual de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial, quando comparado aos valores obtidos após a descongelação, para ambos os protocolos de centrifugação em gradiente de densidade (CapriPure[®] ou Percoll[®]), evidenciando eficiência da seleção de gametas viáveis, independente do método utilizado.

Embora não tenha sido evidenciada diferença significativa, as amostras selecionadas pelo gradiente CapriPure[®] apresentaram valores numericamente maiores de integridade de membrana e de acrossoma, assim como de potencial de membrana mitocondrial, quando comparados àqueles obtidos após seleção pelo gradiente Percoll[®].

Por conseguinte, com base nos resultados de espermatozoides móveis e com membranas intactas, é possível concluir que, para selecionar espermatozoides viáveis de amostras congeladas de sêmen caprino, deve-se usar centrifugação em gradiente de densidade, e que o CapriPure[®] é uma boa alternativa ao uso do Percoll[®]. No entanto, futuras pesquisas

são necessárias para avaliar a capacidade fertilizante destes espermatozoides, após uso do gradiente CapriPure[®].

5 Agradecimentos

À Empresa Paraibana de Pesquisa Agropecuária (EMEPA), pelo uso dos reprodutores, à Dr^a. Emma Holms da Nidacon Laboratories AB (Göthenborg, Sweden) pela doação do CapriPure[®] e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor.

6 Referências

AVERY, B.; GREVE, T. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. **Theriogenology**, v. 44, p. 871-878, 1995.

CESARI, A. et al. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. **Theriogenology**, v. 66, p. 1185-1193, 2006.

CHEN, M.J.; BONGSO, A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. **Human Reproduction**, v. 14, p. 759-764, 1999.

COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 101-104, 2002.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. **Theriogenology**, v. 46, p. 1225-1232, 1996.

DODE, M.A.N. et al. The effects of sperm preparation and co-incubation time in vitro fertilization of *bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 15-23, 2002.

FUKUDA, Y. et al. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and culture with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 114-119, 1990.

- GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram sperm. **Theriogenology**, v. 54, p. 93-108, 1999.
- GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 447-454, 2004.
- GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2089-2100, 2006.
- KASAI, T. et al. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility and fertility potential. **Asian Journal of Andrology**, v. 4, p. 97-103, 2002.
- KHALIFA, T.A.A.; EL-SAIDY, B.E. Pellet-freezing of Damascus goat semen in chemically defined extender. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 303-315, 2006.
- LONERGAN, P. et al. Effect of follicles size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 48-53, 1994.
- MARCO-JIMÉNEZ, F. et al. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. **Cryobiology**, v. 52, p. 295-304, 2006.
- MARTÍ, E. et al. Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 746-753, 2006.
- MAXWELL, W.M.C. et al. Retained functional integrity of bull spermatozoa after double freezing and thawing using PureSperm[®] density gradient centrifugation. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 42, p. 489-494, 2007.
- MENDES Jr, J.O.B. et al. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, v. 60, p. 331-340, 2003.
- NEVO, A.C.; MOHAN, R. Migration of motile spermatozoa into sperm-free medium and the 'dilution effect'. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, p. 379-381, 1969.
- PALOMO, M.J. et al. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 51, p. 927-940, 1999.

- PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either *Swim-up* or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-869, 1995.
- PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. **Journal Biochemical and Biophysical Methods**, v. 44, p. 1-30, 2000.
- RHO, G.J.; HAHNEL, A.C.; BETTERIDGE, K.J. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects in the production of goat embryo in vitro. **Theriogenology**, v. 56, p. 503-516, 2001.
- RITAR, A.J. Control of ovulation, storage of semen and artificial insemination of fibre-producing goats in Australia: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 33, p. 807-820, 1993.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean up. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 297-308, 1997.
- ROTH, T.L. et al. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 475-482, 1998.
- SALISBURY, G.W.; Van DEMARK, N.L. Diluents and extension of semen. In: **Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle**. San Francisco: W.H. Freeman, p. 434-435, 1978.
- SAMARDZIJA, M. et al. A comparison of BoviPure[®] and Percoll[®] on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 237-247, 2006.
- SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A simple, non-traumatic *Swim-up* method for the selection of spermatozoa for *in vitro* fertilization in the bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 61-75, 1994.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SOMFAI, T. et al. Effect of *Swim-up* and Percoll treatment on viability and acrossome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 37, p. 285-290, 2002.

SOUZA, A.F. et al. Congelamento de sêmen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl. 5, p. 103-105, 2002.

STERZIK, K. et al. Glass wool filtration leads to a higher percentage of spermatozoa with intact acrosomes: an ultrastructural analysis. **Human Reproduction**, v. 13, p. 2506-2511, 1998.

STREHLER, E. et al. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (Notulae Seminologicae 13). **Human Reproduction**, v. 13, p. 120-123, 1998.

Tabela 1. Média e desvio padrão ($\bar{X} \pm D.P.$) das características espermáticas de amostras criopreservadas de sêmen caprino imediatamente pós-descongelamento e após seleção utilizando os métodos *Swim-up* e gradiente de densidade Percoll[®]

Tratamento	MP (%)	iMP (%)	iAC (%)	Alto PMM (%)
PD	58,33 ± 7,53 ^a	35,50±10,98 ^a	58,75±29,59	40,33±34,88
<i>Swim-up</i>	30,00± 6,32 ^b	11,25±10,50 ^b	33,33±12,69	6,25±12,04
Percoll [®]	65,83±19,08 ^a	32,25±16,61 ^a	54,83±25,34	32,25±33,02

PD= pós-descongelamento; MP= motilidade progressiva; iMP= integridade de membrana plasmática; iAC= integridade de acrossoma; PMM= potencial de membrana mitocondrial; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($P<0,05$) entre tratamentos.

Tabela 2. Média e desvio padrão ($\bar{X} \pm D.P.$) das características espermáticas de amostras criopreservadas de sêmen caprino imediatamente pós-descongelamento e após seleção utilizando os meios para gradiente de densidade Percoll[®] e CapriPure[®]

Tratamento	Concentração (x 10 ⁶ / mL)	MP (%)	iMP (%)	iAC (%)	Alto PMM (%)
PD	135,00±46,55	53,75±7,50	41,88±9,10	66,88±16,22 ^a	10,75±12,84 ^b
Percoll [®]	47,00±39,00	61,25±7,50	31,25±2,99	36,50±8,29 ^b	49,13±10,06 ^a
CapriPure [®]	30,25±26,96	55,00±5,77	40,63±19,10	42,63±15,16 ^{ab}	63,25±12,94 ^a

PD= pós-descongelamento; MP= motilidade progressiva; iMP= integridade de membrana plasmática; iAC= integridade de acrossoma; PMM= potencial de membrana mitocondrial; Letras distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($P<0,05$) entre tratamentos.

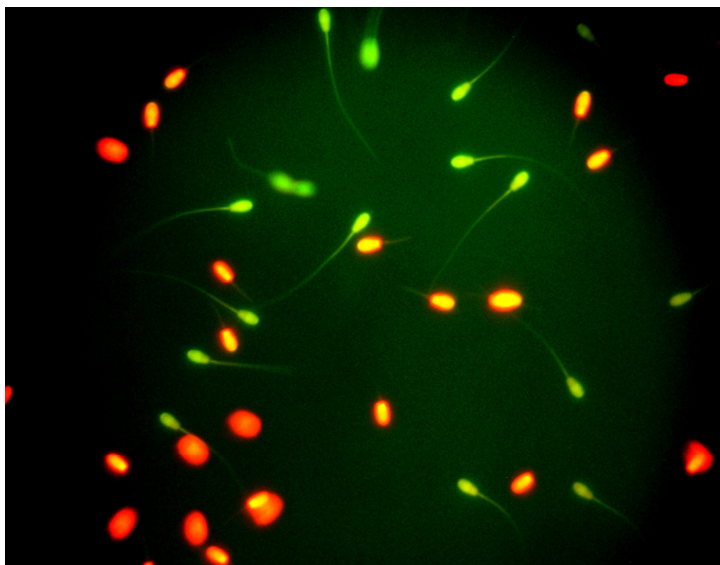


Figura 1. Espermatozoides caprinos submetidos à seleção com *Swim-up*, corados por DCF/IP, portadores de membranas plasmáticas intactas (verde) e lesadas (vermelho).

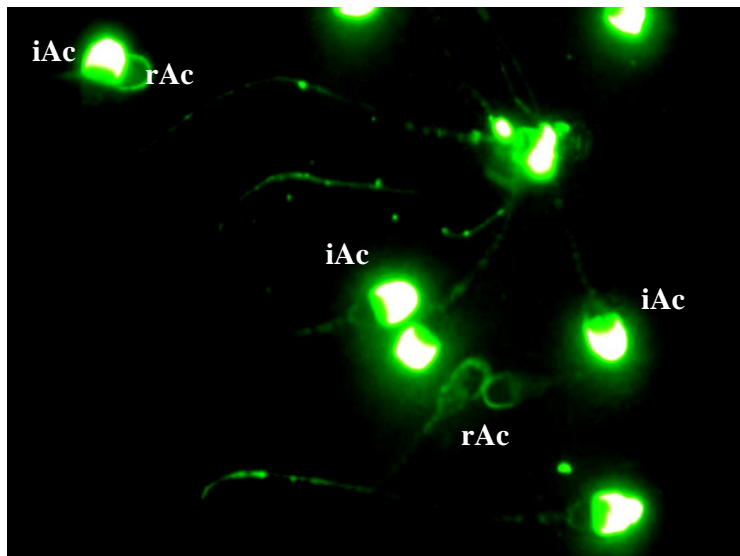


Figura 2. Espermatozoides caprinos submetidos à seleção em gradiente de densidade Percoll[®], corados por FITC/PNA, portadores de acrosomas intactos (iAc) e reagido (rAc) (1000x).

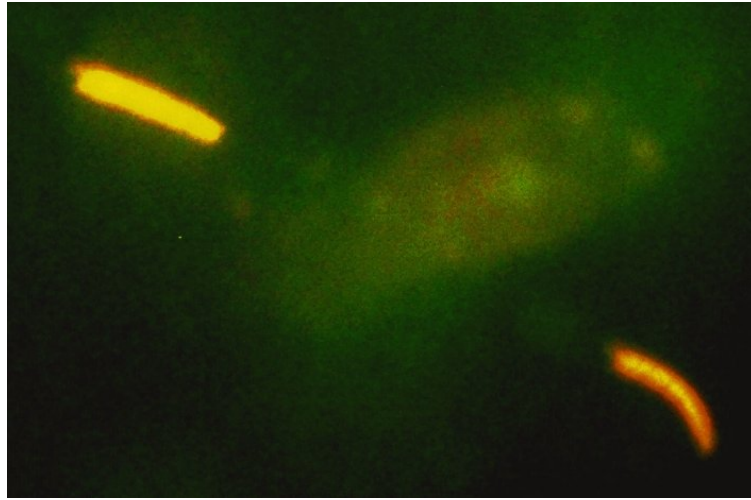


Figura 3. Espermatozoides caprinos submetidos à seleção em gradiente de densidade CapriPure[®], corados por JC-1, apresentando elevado potencial de membrana mitocondrial (1000x).