

ALINE SARAIVA DE OLIVEIRA

LOCALIZAÇÃO DA Na⁺, K⁺-ATPase EM ESPERMATOZOIDES OVINO *IN NATURA*, PÓS-DESCONGELAÇÃO E CAPACITADOS *IN VITRO* E DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DE SEU BLOQUEIO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS

GARANHUNS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES

ALINE SARAIVA DE OLIVEIRA

LOCALIZAÇÃO DA Na⁺, K⁺-ATPase EM ESPERMATOZOIDES OVINO *IN*
***NATURA*, PÓS-DESCONGELAÇÃO E CAPACITADOS *IN VITRO* E**
DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DE SEU BLOQUEIO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Ribeiro
Câmara

GARANHUNS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

O48L Oliveira, Aline Saraiva de
Localização da NA^+ , K^+ -ATPase em espermatozoides *ovino*
in
natura, pós-descongelamento e capacitados *in vitro* e
determinação
dos efeitos de seu bloqueio sobre as características
espermáticas
/ Aline Saraiva de Oliveira. - 2018.

77 f. : il.

Orientador(a): Maria Madalena Pessoa Guerra.

Coorientador(a): Diogo Ribeiro Câmara

Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós - Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, Garanhuns, BR - PE, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Carneiros 2. Sêmen 3. Reprodução animal I. Guerra, Maria Madalena Pessoa, orientadora. II. Câmara, Diogo Ribeiro, Coorient.
III. Título.

CDD 636.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES

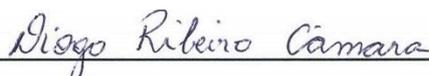
LOCALIZAÇÃO DA Na⁺, K⁺-ATPase EM ESPERMATOZOIDES OVINO IN
NATURA, PÓS-DESCONGELAÇÃO E CAPACITADOS IN VITRO E
DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DE SEU BLOQUEIO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS

Dissertação elaborada por

ALINE SARAIVA DE OLIVEIRA

Aprovada em 01 de março de 2018

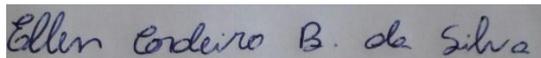
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Diogo Ribeiro Câmara — Co-orientador -UFAL



Prof. Dr. André Mariano Batista- UFRPE



Profa. Dra. Ellen Cordeiro Bento da Silva- UFRPE

GARANHUNS

2018

“ A toda minha família pelo carinho, apoio e compreensão”

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **DEUS**, pela vida de todos nós!

A minha família, em especial ao meu ponto de Luz, minha filha **Lis**, por me mostrar e permitir viver e sentir algo inimaginável;

Ao meu esposo Diogo por todo o amor, carinho, incentivo e **serenidade**;

À professora Dra **Maria Madalena Pessoa Guerra** e ao professor **Dr. Diogo Ribeiro Câmara**, pela confiança e oportunidade de realizar o mestrado e vivenciar mais esta etapa da minha vida;

Ao Dr. **André Mariano Batista** por todos os ensinamentos, pela atenção, paciência e disponibilidade em me ensinar sempre, **Muito obrigada**;

Aos amigos do ANDROLAB (**André, Robespierre, Lucinha, Milena, Thalles, Julianne, Mergulhão, Helder, Wilton, “Joana, Raqué e Bruna”**) pelo acolhimento, ensinamentos, apoio e amizade;

Muito Obrigada, sem vocês não seria possível viver mais esta etapa!

RESUMO

Objetivando-se localizar a Na^+ , K^+ -ATPase em espermatozoides ovinos (*in natura*, pós descongelamento e capacitados *in vitro*), assim como avaliar a influência da adição da ouabaína sobre os parâmetros cinemáticos espermáticos, foram realizados dois experimentos. Exp.1: amostras de sêmen (quatro carneiros, sete repetições) foram colhidas, diluídas (Tris-gema, concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL) e congeladas à -196 C° . Exp. 2: amostras seminais de quatro ovinos (cinco repetições) foram diluídas em meio TALPm (50×10^6 espermatozoides/mL) e aliqüotadas em dois grupos: parte destinada a capacitação *in vitro* (adição de 2,5% de soro de ovelha em estro - SOE) ou com adição de ouabaína (10^{-4} M), visando o bloqueio da Na^+ , K^+ -ATPase. Alíquotas de sêmen de ambos os experimentos foram avaliadas pelo sistema CASA para análise dos parâmetros de cinemática espermática, e por meio da citometria de fluxo, para a localização da Na^+ , K^+ -ATPase (Bodipy FL Ouabaína), análise da integridade de membrana plasmática (IP) e acrossomal (FITC-PNA), viabilidade e estabilidade de membrana plasmática (YO-PRO e M540). No Exp. 2, além das análises supracitadas realizou-se também a avaliação do potencial de membrana mitocondrial (JC-1). Para o Exp. 2, todas as análises foram efetuadas após 0h e 3h de incubação a $36 \text{ }^\circ\text{C}$. Os resultados obtidos foram: 1) a Na^+ , K^+ -ATPase foi localizada na peça intermediária dos espermatozoides independente do *status* da amostra (*in natura*, pós descongelamento e capacitados); 2) o processo de congelamento/descongelamento resultou em uma diminuição ($P < 0,05$) nos parâmetros de MT, MP e VAP, um aumento no BCF, além de redução ($P < 0,05$) no percentual de células apresentando marcação com Bodipy FL Ouabaína, com membranas plasmáticas e acrossomal íntegras, e percentagem de células com membrana plasmática estabilizada; 3) A longo do período de incubação, o bloqueio da Na^+ , K^+ -ATPase resultou na redução ($P < 0,05$) da MP, VCL e VSL, enquanto no grupo controle observou-se redução ($P < 0,05$) dos parâmetros MT, VCL e ALH; 4) A adição do SOE ao meio de TALPm resultou em redução ($P < 0,05$) em MP, VCL e ALH, enquanto no grupo controle reduziu ($P < 0,05$) os valores de MT e MP, não havendo diferença entre tratamentos para os parâmetros cinemáticos. Além disso, independentemente dos tratamentos, observou-se ao longo da incubação elevação ($P < 0,05$) no percentual de células apresentando membrana plasmática lesionadas, acrossomal íntegra sem marcação da Na^+ , K^+ -ATPase. Em conclusão, independente do *status* fisiológico, a Na^+ , K^+ -ATPase não alterou sua localização, permanecendo na peça intermediária dos espermatozoides ovinos, e que, sua inibição não influenciou sobre os parâmetros de motilidade espermática.

Palavras-chave: bomba de sódio, canal iônico, carneiro, sêmen.

ABSTRACT

Aiming to localize the Na⁺, K⁺-ATPase in ram sperm (raw, post-thaw and capacitated *in vitro*), and to evaluate the influence of ouabain addition on kinematic sperm parameters, two experiments were performed. Exp.1: semen samples (four rams, seven replicates) were harvested, diluted (Tris-gema, final concentration 200 x 10⁶ sperm/mL) and frozen at -196 C°. Exp. 2: semen samples from four rams (five replicates) were diluted in TALPm (50 x10⁶ sperm/mL) and aliquot for two procedures: *in vitro* capacitation (addition of 2,5% of estrous sheep serum - ESS) or ouabain addition (10⁻⁴ M), in order to block the Na⁺,K⁺-ATPase. Semen aliquots from both experiments were evaluated using CASA system for kinematic parameters and with aid of flow cytometry it was determined localization of Na⁺, K⁺-ATPase (Bodipy FL Ouabaina), evaluated plasmatic (IP) and acrosomal membrane (FITC-PNA) integrity, viability and stability of sperm plasma membrane (YO-PRO e M540). During Exp. 2, it was also evaluated the mitochondrial membrane potential (JC-1). For Exp. 2, all analysis were performed at 0h and 3h of incubation time (36 °C). These are the results: 1) The Na⁺, K⁺-ATPase was localized on middle piece of sperm flagellum, despite sample *status* (raw, post-thaw and capacitated); 2) the freezing-thawing process reduced (P<0,05) MT, MP and VAP and increased BCF. There was also a reduction (P<0.05) on percentage of sperm stained with Bodipy FL Ouabain, with intact plasmatic and acrosomal membranes, and percentage of sperm with stabilized plasma membrane; 3) Through incubation time, the Na⁺, K⁺-ATPase blocking reduced (P<0.05) MP, VCL and VSL, whereas on control group reduced (P <0.05) MT, VCL and ALH; 4) The addition of ESS to TALPm reduced (P<0.05) MP, VCL and ALH, and on control group reduced (P<0.05) MT and MP, with no difference between treatments for kinematic parameters. Therefore, despite of treatment, there was an increasing (P<0.05) on percentage of sperm with damages plasma membrane, intact acrosome and no stain for Na⁺, K⁺-ATPase. In conclusion, despite of sperm physiological *status*, Na⁺, K⁺-ATPase remains on middle piece of ram sperm flagellum and its inhibition have no influence on sperm motility parameters.

Key words: sodium pump, ionic channel, ram, semen.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localização da Na^+, K^+ -ATPase em espermatozoide ovino <i>in natura</i> (A), pós descongelação (B) e capacitado (C), através da citometria de fluxo utilizando o fluorocromo Bodipy® FL Ouabaína.....	54
Figura 2. Capacidade de ligação do fluorocromo Bodipy® FL Ouabaína em espermatozoides ovinos incubados em meio TALPm após três horas de incubação (38,5 °C) em meio sem (A) e com (B) adição de ouabaína (10^{-4} M).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

° C – Graus celcius

ALH – Amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

ATP – Adenosina Trifosfato

BCF – frequência de batimento flagelar cruzado

BD-FL – Bodipy® FL Ouabaína

BSA – Albumina sérica bovina

Ca⁺ – Íons Cálcio

Ca⁺-ATPase – Canal iônico cálcio ATPase

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

cAMP – Monofosfato Cíclico de Adenosina

CASA – Computer Assisted Sperm Analysis

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

Cd – Cádmo

CEUA – Comissão de ética para uso de animais

Cu – Cobre

DMSO – Dimetilsufóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleicos

FITC – Isotiocionato de fluoresceína

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

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

H – Hidrogênio

H⁺, K⁺ -ATPase – Canal iônico hidrogênio, potássio ATPase

HCO₃⁻ – Íons bicarbonato

IA – Inseminação artificial

iAC – Integridade de acrossoma

iMP – Integridade de Membrana Plasmática

IP – Iodeto de Propídeo

JC-1 – 5,5',6,6'-tetracloro 1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina

K⁺ – Íons potássio

KCl – Cloreto de Potássio

kDa – Quilodalton

LIN – Linearidade
M – Molar
M540 – Merocyanine 540
Mg – Magnésio
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
Min – Minutos
mL – Mililitros
MP – Motilidade progressiva
MT – Motilidade total
mM – Milimolar
Na⁺ – Íons sódio
Na⁺,K⁺-ATPase – Canal iônico sódio, potássio ATPase
NaCl – Cloreto de Sódio
NaH₂PO₄ – Fosfato de sódio
NaHCO₃ – Carbonato de sódio
nm – Nanômetro
PBS – tampão fosfato de sódio
pH – Potencial hidrogeniônico
PMM – Potencial de membrana mitocondrial
ROS – Espécies reativas de oxigênio
R123 – Rodamina 123
SOE – Soro de ovelha em estro
SR Ca⁺-ATP-ase – Canal iônico cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
STR – Retilinearidade
TALPm – Meio TALP modificado
TGO – Tris-gema de ovo
UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco
VAP – Velocidade média do percurso
VCL – Velocidade curvilínea
VSL – Velocidade em linha reta
WOB – Índice de oscilação
YO – YO-PRO®-1 iodide mM
ZP – Zona pelúcida
μL – Microlitro

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO..... 12
2	OBJETIVOS..... 14
2.1	Geral..... 14
2.2	Específicos..... 14
3	REVISÃO DE LITERATURA..... 15
3.1	Célula Espermática..... 15
3.2	Membrana Plasmática..... 17
3.3	Capacitação espermática..... 18
3.4	Na⁺,K⁺-ATPase..... 20
3.5	Influência do bloqueio da Na⁺,K⁺-ATPase na reprodução do macho 21
3.6	Criopreservação..... 22
3.7	Testes laboratoriais para avaliação espermática..... 25
3.7.1	Sistema computadorizado para avaliação espermática – CASA..... 25
3.7.2	Citometria de Fluxo..... 26
3.7.2.1	Análise da integridade da membrana plasmática 27
3.7.2.2	Análise da integridade da membrana acrossomal..... 28
3.7.2.3	Análise da atividade mitocondrial..... 28
3.7.2.4	Análise da estabilidade de membrana..... 29
4	REFERÊNCIAS..... 30
	ARTIGO: Localização da Na⁺,K⁺-ATPase em espermatozoides de ovinos <i>in</i> 44 <i>natura</i> , pós descongelação e capacitados <i>in vitro</i> e determinação dos efeitos de seu bloqueio sobre as características espermáticas
	ANEXO 1– Licença do Comitê de Ética para Uso de Animais 76

1 INTRODUÇÃO

Os espermatozoides são células polarizadas (BEDFORD e HOSKINS, 1990), contidas por cabeça e flagelo unidos através do colo e revestidas pela membrana plasmática (EDDY e O'BRIEN, 1994; MORTIMER, 1997). A membrana plasmática é extremamente importante para sobrevivência do espermatozoide no trato genital feminino e manutenção da função do gameta (PARKS e GRAHAM, 1992), uma vez que é responsável, dentre outras funções, pela manutenção do equilíbrio osmótico (AMANN e GRAHAM, 1993), garantindo a homeostase e a viabilidade celular (CELEGHINI, 2005).

Independentemente da espécie, a membrana plasmática é caracterizada por uma bicamada lipídica, composta por fosfolipídios, esteróis e proteínas integrais ou periféricas, que dispõem-se em um modelo mosaico fluido (SINGER e NICHOLSON, 1972; EDDY e O'BRIEN, 1994), diferenciando-se quanto a proporção e distribuição dos seus constituintes (HOLT e NORTH, 1985) e disposição dos mesmos em regiões especializadas e domínios da membrana (THOMPSON, 1993; EDDY e O'BRIEN, 1994).

O modelo mosaico fluido apresentado pelas membranas é possível devido as interações não covalentes entre os lipídios e proteínas, permitindo a movimentação lateralizada destes componentes (BORGES et al. 2011). De acordo com Lehninger et al. (2000) os lipídios distribuem-se de forma assimétrica nas duas faces da membrana plasmática, especificamente a esfingomielina e fosfatidilcolina no folheto externo e a fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol no folheto interno. Já as proteínas classificam-se em integrais e periféricas, sendo as integrais de suma importância, uma vez que, agem como canais ou poros e são dispostas entre as camadas membranares (AMANN e PICKETT, 1987).

Dentre as proteínas integrais, destaca-se a sódio-potássio-adenosina-trifosfatase (Na^+ , K^+ -ATPase) ou bomba de sódio, que atua diretamente na homeostase celular e serve como receptor para glicosídeos cardíacos, como a ouabaína e a digoxina (LINGREL e KUNTZWEILER 1994; PENG et al., 1996; SANDTNER et al., 2011). Estruturalmente a Na^+ , K^+ -ATPase é composta principalmente por duas subunidades (α e β), associando-se um dos tipos da subunidade α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$) a um dos tipo de subunidade β ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$) (NEWTON et al., 2010; CÂMARA et al., 2017).

A bomba de sódio é responsável por diferentes processos celulares, como a manutenção do gradiente de Na^+ e K^+ através da membrana plasmática, essencial para o transporte de outros íons através da membrana e regulação do gradiente osmótico (LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; BLANCO e MERCER, 1998), atuando indiretamente na regulação do pH e

concentrações de Ca^{+} intracelulares (BLANCO e MERCER, 1998; THERIEN e BLOSTEIN, 2000). Seu funcionamento dar-se por meio da energia obtida a partir da hidrólise de moléculas de ATP (LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; BLANCO e MERCER, 1998).

Em relação a atividade reprodutiva dos machos, especificamente as células espermáticas, a troca de íons Na^{+} e K^{+} , através da membrana plasmática, desempenha um papel crucial para sua fisiologia, incluindo a motilidade espermática, capacitação e reação acrossomal (JIMENEZ, 2011). Além disso, de acordo com Blanco et al. (2011), a $\alpha 4$ é a isoforma predominante responsável pelo transporte ativo destes íons através da membrana espermática, apresentando uma maior afinidade pela ouabaína, que atua de forma inibitória sobre a funcionalidade da $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase (SCHOONER, 2002; SCHNEEBERGER e LYNCH, 2004).

Em relação ao padrão de distribuição desta proteína em diferentes espécies, a subunidade $\alpha 4$ foi localizada principalmente na cabeça dos espermatozoides de touros (NEWTON et al. 2010), atuando no processo de capacitação espermática (GUR e BREITBART, 2006), e de forma menos intensa sobre a motilidade espermática. Além disso, o bloqueio da atividade da $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase com ouabaína resultou em mudanças semelhantes as que ocorrem durante o processo de capacitação (THUNDATHIL et al., 2006; NEWTON et al., 2010).

Em ratos, camundongos, hamsters e humanos, a subunidade $\alpha 4$ foi identificada na região do flagelo (WAGONER et al. 2005; SANCHEZ et al. 2006), e sua atividade influenciou diretamente com a motilidade espermática (WOO et al., 2000; WOO et al. al., 2002; SANCHEZ et al., 2006; JIMENEZ et al., 2011a, 2011b; McDERMOTT et al., 2015), e, de forma mais discreta, a capacitação espermática em ratos (JIMENEZ et al., 2012).

Uma vez que na literatura não foram identificados relatos sobre a localização da $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase em espermatozoides ovinos, e os estudos encontrados sobre a avaliação da influência desta proteína na cinemática espermática não foram realizados utilizando as novas técnicas de avaliação da qualidade espermática, esse estudo tem como objetivo pesquisar informações básicas e iniciais sobre a função e localização da $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase em espermatozoides ovinos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Localizar a Na^+ , K^+ -ATPase em espermatozoides ovinos sob diferentes *status* fisiológicos e avaliar a influência do bloqueio desta proteína sobre as características espermáticas.

2.2 Específicos

Localizar a Na^+ , K^+ -ATPase em espermatozoides de ovinos e evidenciar alterações em sua distribuição em amostras de sêmen sob diferentes *status* fisiológico (*in natura*, capacitados *in vitro* e pós descongelamento);

Avaliar a influência do bloqueio da Na^+ , K^+ -ATPase sobre a cinemática e aspectos funcionais espermáticos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Célula Espermática

Inicialmente descritos por Van Leeuwenhoek em 1677 (PESCH e BERGMANN, 2006; SILVA e GADELLA, 2006), os espermatozoides são células altamente especializadas que têm como principal objetivo a fertilização oocitária (AMANN e PICKETT, 1987). Uma descrição morfológica simples, permite dividir os espermatozoides dos mamíferos em cabeça, colo e flagelo (HAFEZ e HAFEZ, 2004; PESCH e BERGMANN, 2006).

A cabeça apresenta-se de forma hidrodinâmica, exercendo influência benéfica na motilidade e capacidade de penetração da célula, composta por um núcleo compactado rico em ácidos desoxirribonucleicos (DNA) (BREWER, et al., 2002; DADOUNE, 2003), sendo este, carregado para o citoplasma do oócito após a fertilização (MOTA FILHO, 2009). Outra estrutura presente na cabeça é o acrossoma, organela situada entre a membrana plasmática e a região anterior do núcleo, composta por enzimas hidrolíticas como a pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas (MOTA FILHO, 2009), essenciais à lise da zona pelúcida (ZP) e penetração do espermatozoide no oócito, fenômenos relacionados ao processo de reação acrossomal (WASSARMAN, 2002; PESCH e BERGMANN, 2006).

Além da cabeça, os espermatozoides possuem um flagelo, que se une à cabeça através do colo (FOUQUET e KANN, 1994; SILVA, 2010). O flagelo apresenta uma estrutura central denominada axonema (formada a partir de um complexo de microtúbulos) e é subdividido em três regiões: peça intermediária, principal e terminal (FOUQUET e KANN, 1994; HAFEZ e HAFEZ, 2004; PASUPULETI, 2007). O axonema é formado por um par de microtúbulos centrais e nove pares de microtúbulos periféricos, interligados através da dineína, proteína motora que permite o batimento axonal, através do deslizamento destes microtúbulos, por meio da hidrólise da Adenosina Trifosfato (ATP) e transformação de energia química em energia mecânica (MORTIMER, 1997; PESCH e BERGMANN, 2006).

A peça intermediária está localizada entre o colo e o *annulus*, estrutura que conecta a peça principal do flagelo (CELEGHINI, 2005). Composta por mitocôndrias, dispostas de modo helicoidal, envolvendo as fibras densas e o axonema (BACCETTI e AFZELIUS, 1976; AMELAR, et al., 1980; PESCH e BERGMANN, 2006), sendo as mitocôndrias responsáveis pela produção de ATP através da fosforilação oxidativa (SILVA e GADELLA, 2006). Alterações na peça intermediária exercem influência direta na produção energética,

necessária ao movimento flagelar (GRAVANCE et al., 2000; CELEGHINI, et al., 2007; ARRUDA, et al., 2015).

A peça principal é formada pelo axonema e fibras densas, enquanto a peça terminal é constituída apenas por microtúbulos individuais (SILVA, 2010). No entanto, ambas têm como função atuar junto a peça intermediária sobre a motilidade espermática (FLESCH e GADELLA, 2000).

A motilidade é um importante parâmetro relacionado à função espermática (PICKETT e AMANN, 1993), sendo o principal responsável pelo transporte da célula através do trato reprodutivo das fêmeas, além de influenciar a penetração dos espermatozoides no oócito (MORTIMER, 1997), tornando-se indispensável ao processo de fertilização. A cessão irreversível da motilidade é indicativa de perda total da função celular (AMORIM, 2008).

Entretanto, para que as células espermáticas se movam, é necessário que ocorra a contractilidade e relaxamento flagelar (CORREIA e CORREIA, 1985), provenientes do funcionamento de ATPases, proteínas que utilizam o ATP como substrato para produção de energia (SILVA, 2010), sendo a maior parte da produção deste ATP resultado do funcionamento das mitocôndrias, presentes na peça intermediária dos espermatozoides (TRAVIS, et al.,1998; CÂMARA e GUERRA, 2008).

Com relação as mitocôndrias, estudos em diferentes espécies foram realizados a fim de avaliar o real papel destas organelas sobre a funcionalidade espermática, especificamente na produção de ATP (TRAVIS, et al.,1998), uma vez que em espermatozoides de camundongos a inibição da atividade mitocondrial, junto a suplementação do meio com substratos de glicose, não influenciou os níveis de ATP nem o batimento flagelar, ocorrendo o inverso quando da inibição da glicólise, que estimulou a fosforilação oxidativa, com redução drástica nos níveis de ATP e no batimento flagelar (MUKAI e OKUNO, 2004). Resultados semelhantes foram observados por Nascimento et al. (2008) em espermatozoides humanos.

Estes resultados controversos com relação ao papel das mitocôndrias sobre a produção de energia supracitados, junto aos resultados encontrados em demais estudos, levam autores à concluir que, a fosforilação oxidativa não é suficiente para suprir a necessidade energética para a motilidade espermática, ressaltando a via glicolítica como principal fonte de energia, a depender da espécie (LOSANO et al., 2017).

3.2. Membrana Plasmática

A membrana plasmática é a camada mais externa presente nas células espermáticas, tornando-a susceptível a diversas mudanças decorrentes do processamento de sêmen, como a criopreservação (BORGES et al., 2011). Quando íntegra, esta membrana garante a manutenção da homeostase celular, atuando como barreira entre os meios intra e extracelular (AMANN e PICKET, 1987).

Formada por uma bicamada lipídica, arranjada em um modelo de mosaico fluido (SINGER e NICOLSON, 1972) em consequência das ligações não covalentes entre lipídeos e proteínas (BORGES et al., 2011), o que permite uma movimentação lateralizada dos lipídeos ao longo da membrana plasmática (QUINN, 1985; AMANN e PICKET, 1987; LEHNINGER, et al., 1995; AMORIM, 2008; BORGES et al., 2011). Estas interações são essenciais para a formação dos domínios e subdomínios presentes na membrana plasmática (FLESH e GADELLA, 2000), que se diferenciam entre eles de acordo com o tamanho, estabilidade, composição de lipídeos/proteínas e funcionalidade (FLESH e GADELLA, 2000; WASSALL e STILLWEL, 2009).

Os lipídeos presentes nas membranas apresentam sua extremidade apolar direcionada ao interior da bicamada lipídica e a região polar para o meio extracelular ou citoplasmático (LEHNINGER, et al., 1995; GADELLA, 2008). Dentre os lipídeos que compõem a membrana plasmática nos espermatozoides, aproximadamente 70% são fosfolipídeos, 25% lipídeos neutros e apenas 5% são glicolipídeos (MANN e LUTWAK-MANN, 1981).

Já as proteínas, que constituem 50% da massa da membrana, são classificadas em integrais e as periféricas (SOUSA e BICUDO, 2003; SIQUEIRA, 2004; AMORIM, 2008), diferenciando-se com base na capacidade de dissociação da membrana plasmática. As proteínas periféricas não se inserem na região hidrofóbica da membrana e podem se dissociar através de reagentes polares, soluções com pH básico e ricas em sais, devido a ligação iônica entre estas proteínas e a membrana (COOPER, 2001).

Por outro lado, as proteínas integrais se apresentam de modo transmembranar, expondo suas extremidades tanto no meio extracelular quanto citoplasmático, fazendo com que sua dissociação da membrana ocorra junto à ruptura das ligações hidrofóbicas na bicamada lipídica (COOPER, 2001), servindo como poros ou canais proteicos de membrana e receptores para íons e outras moléculas (AMANN e PICKET, 1987; WATSON, 2000). Dentre os canais proteicos, destacam-se os canais iônicos, que permitem a passagem de íons através da membrana plasmática, por meio da energia obtida a partir da hidrólise do ATP, resultando em

concentração de íons diferente entre os meios intra e extracelular e estabelecimento do gradiente eletroquímico (COOPER, 2001).

Para que as células espermáticas estejam aptas a fertilizar o oócito, as mesmas devem manter-se em equilíbrio iônico (DARSZON et al., 1999; JIMENEZ, et al., 2012), uma vez que alterações na funcionalidade destes canais desencadeiam comprometimento nos processos celulares de capacitação espermática, hiperativação celular e reação acrossômica, culminando com falhas no processo de fertilização (SHUKLA, et al., 2012).

3.3. Capacitação Espermática

Inicialmente descrita por Austin (1951), a capacitação espermática é um processo caracterizado por modificações complexas ocorridas nos espermatozoides, conferindo aos mesmos a capacidade de fertilizar um oócito (GADELLA, 2008). Este processo biológico envolve diferentes etapas, caracterizadas por mudanças bioquímicas e estruturais na membrana plasmática (SILVA, 2010). Estas mudanças são relacionadas a eventos como o aumento na fluidez da membrana plasmática (SENGER, 2003), perda de colesterol da membrana, influxo de íons de cálcio e adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e fosforilação da tirosina das proteínas de membrana (BREITBART e NAOR, 1999), resultando no aumento da afinidade dos espermatozoides à ZP (PUKAZHENTHI et al., 1998), hiperativação (essencial a penetração a ZP) (GADELLA, 2008; NASSAR et al., 1999) e posteriormente indução da reação acrossômica (GADELLA, 2008).

Em nível molecular, alguns constituintes destacam-se quanto a sua influência durante a capacitação espermática. A albumina atua na redistribuição e efluxo do colesterol da membrana plasmática (FLESCHE e GADELLA, 2000; VISCONTI et al., 2002), resultando em uma reorganização estrutural da mesma, de modo a tornar a célula responsiva a reação acrossômica e hiperativação da motilidade (FLESCHE e GADELLA, 2000). O colesterol, que confere estabilidade à membrana plasmática, é um determinante da capacitação espermática, e seu efluxo resulta na desestabilização da membrana, assim, aumentando a fluidez da mesma (SMITH et al., 1998), tornando-a mais permeável a íons de cálcio, bicarbonato e potássio (LIMA, 2008).

Íons bicarbonato (HCO_3^-) atuam no aumento do pH intracelular (ZENG, et al., 1996), assim como na ativação da adenilato ciclase, induzindo a elevação dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (FLESCHE e GADELLA, 2000; GADELLA e

HARRISON, 2008) e estimulando a proteína quinase A (PKA) na indução da fosforilação da tirosina. Agem, de forma direta e/ou indireta, sobre o deslocamento de fosfolipídeos, ocasionando alterações na estrutura da membrana, resultando em células espermáticas capacitadas (SOUSA e BICUDO, 2003), assim como na capacidade de ligação dos espermatozoides às proteínas solubilizadas presentes na ZP (OSHEROFF et al., 1999; GADELLA, 2008; TANNO, 2009). Estudos enfatizaram a importância do bicarbonato para capacitação espermática quando relacionaram a redução de seus níveis a diferentes eventos, como a inibição da fosforilação da tirosina (VISCONTI et al., 1995), diminuição da capacidade dos espermatozoides de se ligar às proteínas específicas da ZP (HARKEMA et al., 1998), assim como inibição da ativação da hipermotilidade espermática (BOATMAN e ROBBINS, 1991).

O influxo de cálcio estimula a capacitação (NAZ e RAJESH, 2004) e reação acrossomal (FLORMAN et al., 1992). O aumento de seus níveis intracelulares atuam na hiperativação espermática, através de sua ação excitatória sobre a adenilato ciclase, resultando em elevação nas concentrações de AMPc, que agem no flagelo, especificamente na peça intermediária dos espermatozoides (SENGER, 2003). A hiperativação é um evento de suma importância para capacidade fertilizante dos espermatozoides e, de acordo com Verstegen, et al., (2002), caracteriza-se por mudanças no padrão da motilidade espermática, apresentando movimentos vigorosos não progressivos e não lineares, com maior amplitude na lateralização da cabeça e flagelo, com redução na frequência dos batimentos flagelares e elevação na movimentação da curvatura e de movimentos circulares.

Outros íons que desempenham influência sobre a capacitação espermática são o sódio (Na^+) e o potássio (K^+), que atuam sobre a manutenção do gradiente iônico da membrana celular (SOUSA, 2003), de modo que nos espermatozoides os níveis intracelulares de K^+ são maiores quando comparado aos de Na^+ (SOUSA e BICUDO, 2003). Este gradiente iônico é mantido através do funcionamento da bomba Na^+ , K^+ -ATPase. No entanto, durante o processo de capacitação espermática, estas concentrações se alteram significativamente, caracterizando-se pela redução dos níveis intracelulares de K^+ (SOUSA e BICUDO, 2003) e elevação nas concentrações de Na^+ (YANAGIMACHI, 1994).

De acordo com Fraser et al. (1993) a Na^+ , K^+ -ATPase induz a despolarização da membrana durante a capacitação, uma vez que, durante seu estudo observaram que houve uma inibição da capacitação espermática em ratos, quando o sêmen foi incubado em meio de

capacitação com reduzidos níveis de sódio, ocorrendo de modo inverso da reação acrossomal, que necessita de maiores níveis de Na^+ .

3.4 Na^+ , K^+ -ATPase

A Na^+ , K^+ -ATPase, também conhecida por bomba de sódio, foi inicialmente descrita por Skou no ano de 1957, ao reportar a existência na membrana celular, de uma enzima que, na presença de íons de sódio, potássio e magnésio promovia a hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) (TIAN e XIE, 2008), desempenhando um papel fundamental, direto ou indireto, em diferentes processos celulares dependentes de gradiente eletroquímico (LEHNINGER, et al., 1995; BLANCO e MERCER, 1998; SANCHEZ et al., 2006).

Caracterizada como uma enzima transmembranar (APELL, 2004), a bomba de sódio é constituída por dois principais polipeptídeos, a unidade catalítica α , de peso molecular de 110 – 112 kDa e que apresenta quatro tipos ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$), e a unidade regulatória β , que apresenta menor peso molecular 55 kDa e é constituída por três tipos ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$) (SUHAIL, 2010). Estas subunidades se associam, de modo que, uma subunidade de α se liga a uma de β formando isoformas (CÂMARA et al., 2017), sendo, $\alpha 1\beta 1$ a isoforma presente na maiorias dos tecidos (THUNDATIL et al., 2012), enquanto as demais distribuem-se de maneira mais restrita (BLANCO, 2005a).

A atividade molecular e arranjo estrutural da Na^+ , K^+ -ATPase é regulada pelas interações lipídio-proteína, através de propriedades físicas, como a espessura e hidrofobicidade da bicamadalipídica (CORNELIUS et al., 2015), ou químicas, como a composição de lipídios da membrana que influencia de modo a alterar a orientação da subunidade β e configuração da bomba de sódio (HICKEY e BUHR, 2011). Vale ressaltar que o colesterol presente na membrana plasmática exerce suma importância a estabilidade da Na^+ , K^+ -ATPase, uma vez que este é o local de ligação desta proteína à membrana, através da junção subunidade β -colesterol (SHINODA et al. 2009). A redução do níveis de colesterol na membrana plasmática resultam em mudanças a bomba de sódio, como a redução da expressão da subunidade $\alpha 1$, indicando que suas configuração tridimensional e exposição do sítio catalítico está relacionada aos níveis de colesterol presente membrana plasmática, influenciando ainda na endocitose e degradação da Na^+ , K^+ -ATPase (CHEN et al., 2011; CHERNIAVSKY-LEV et al. 2014).

Estudos vêm sendo realizados para identificação e localização das subunidades, por exemplo a $\alpha 4$, que limita-se ao trato reprodutor masculino (WOO et al., 2000), e responde por aproximadamente dois terços do transporte ativo de Na^+ e K^+ nos espermatozoides (WAGONER et al., 2005). Nos testículos, foi identificada próxima a subunidade $\alpha 1$ (BLANCO et al., 2000; WOO et al., 2000) e associada tanto a $\beta 1$ quanto $\beta 3$ (SHAMRAJ e LINGREL, 1994; UNDERHILL et al., 1999; BLANCO et al., 2000). Entretanto, $\alpha 4$ e $\alpha 1$ também foram identificadas em células de Sertoli (KONRAD et al., 2011) e em espermatozoides (BLANCO et al., 2000; WOO et al., 2000).

A caracterização bioquímica da subunidade $\alpha 4$ tem sido objeto de diversos estudos, facilitados pela alta afinidade a ouabaína (BLANCO et al., 1999; WOO et al., 1999), além de, diferenciar-se das demais subunidades devido a alta afinidade pelo Na^+ , baixa pelo K^+ (WOO et al., 1999). A ouabaína atua de forma a inibir a atividade da bomba de sódio e potássio (JORGENSEN et al., 2003), acarretando em diferentes alterações celulares, como, a elevação dos níveis intracelulares de Ca^+ (THOMAS, et al., 1990), elevação dos níveis intracitoplasmático de íons Na^+ concomitante à redução nos níveis de K^+ (LEHNINGER, et al., 1995), culminando com ação deletéria em algumas células (MARK et al., 1995; TREVISI et al., 2004).

3.5. Influência do bloqueio da Na^+ , K^+ -ATPase na reprodução do macho

Tanto a subunidade α quanto a β apresentam um padrão de expressão e propriedades enzimáticas particulares (BLANCO, 2005a; BLANCO, 2005b), sendo a $\alpha 4$ com maior sensibilidade a ouabaína, diferenciado das demais subunidades (BLANCO et al., 1999; SANCHEZ, 2006). Estudos vem utilizando a ouabaína para avaliar a influência da Na^+ , K^+ -ATPase em diferentes células, de forma que, o tratamento com diferentes concentrações deste glicosídeo cardíaco resultou em alterações como, a inibição da motilidade espermática (WOO et al., 2000; SANCHEZ, 2006), e influencia no potencial da membrana, na manutenção do pH e nos níveis de cálcio intracelular (SANCHEZ, 2006).

Com relação a influência da bomba de sódio sobre a motilidade espermática em diferentes espécies, a inibição da Na^+ , K^+ -ATPase por meio da adição da ouabaína em sêmen pós descongelação, ocasionou em uma redução significativa da motilidade espermática em cães (MOGAS et al., 2011). Já em ratos, especificamente a isoforma $\beta 1\alpha 4$ (ATP1A4) que foi

localizada em maior abundância na peça intermediária do flagelo de espermatozoides, (WAGONER, 2005; SANCHEZ, 2006), quando inibida, reduziu significativamente a motilidade (WOO, et al., 2000), influenciando ainda, além dos parâmetros cinemáticos, nos níveis intracelulares de Na^+ e Ca^+ , pH e potencial de membrana (JIMENEZ et al., 2010), elementos essenciais para motilidade espermática (QUILL et al., 2006; DARSZON et al., 2007).

Já em espermatozoides de touro, a incubação das amostras de sêmen com ouabaína não interferiu a motilidade espermática total, entretanto, influenciou significativamente na motilidade progressiva e VCL de maneira dose-dependente somente após cinco horas de incubação (THUNDATHIL et al., 2006).

Ressaltando a importância da isoforma $\alpha 4$ para capacidade fertilizante dos espermatozoides, Jimenez, et al. (2011a) demonstraram que camundongos *knouckout* (nulos para $\alpha 4$) apresentaram esterilidade, já Jimenez et al. (2011b) e McDermott et al. (2012) ao aumentar a expressão da isoforma ATP1A4 em camundongos, demonstraram elevação nos parâmetros de motilidade, com padrões de hiperativação, sem alterar a morfologia testicular e espermática.

Em relação ao processo de capacitação espermática, as respostas celulares obtidas a partir da interação ouabaína- Na^+ , K^+ -ATPase são semelhantes aos eventos fisiológicos que ocorrem durante capacitação espermática em mamíferos (THUNDATHIL, et al. 2006), como o aumento intracelular de íons de Na^+ e Ca^+ (YANAGIMACH, 1994), fosforilação da tirosina (MARQUES e SUAREZ, 2004; VISCONTI et al., 1995) e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (DE LAMIRANDE et al., 1997).

3.6 Criopreservação do sêmen

A criopreservação é a biotecnologia que objetiva manter células, tecidos ou embriões em baixas temperaturas por longos períodos (PEGG, 2002), preservando a manutenção estrutural e viabilidade celular (CAVALCANTE et al., 2006). Dessa forma, a criopreservação do sêmen é uma ferramenta indispensável para implantação de outras biotecnologias como, programas de inseminação artificial, produção *in vitro* e transferência de embriões, devido a sua capacidade de aumentar o potencial reprodutivo dos machos (LEITE et al., 2011).

Sua adoção permite a utilização do sêmen por longos períodos, favorece rápida difusão de material genético em diferentes regiões, reduz os custos para aquisição, transporte e

manutenção de reprodutores nas propriedades e a propagação de doenças sexualmente transmissíveis (TRALDI, 1994; CASTELO et al., 2008). A criopreservação do sêmen constitui-se de diferentes etapas, que vai desde a colheita, seguida a diluição, refrigeração, desidratação, congelamento, até a descongelamento celular (MEDEIROS et al., 2002; GALLEGO, 2010).

Apesar das vantagens obtidas através da implantação da criopreservação do sêmen, a mesma pode ocasionar alterações deletérias aos espermatozoides durante todo o seu processamento, acarretando estresse celular, submetendo estas células a condições desfavoráveis para a manutenção de sua viabilidade (PURDY, 2006), o que pode conduzir a danos irreversíveis (CUNHA, 2001) e um elevado número de espermatozoides que não resistem ao processamento (NAGY et al., 2004). Dentre os danos provenientes das alterações celulares destaca-se a redução na motilidade, viabilidade e capacidade dos espermatozoides em se locomover ao longo do trato genital feminino, assim como na fertilidade (SALAMON e MAXWELL, 1995; LEBOEUF, et al., 2000).

Durante o processo de diluição do sêmen, mudanças drásticas ocorridas no pH celular podem ocorrer, resultando em redução da motilidade e fertilidade (PURDY, 2006), assim como, alterações da osmolaridade e consequente redução da integridade celular (CURRY, et al., 1994), interferindo com a viabilidade e capacidade fertilizante dos espermatozoides após a criopreservação (MOLINIA et al., 1994). A próxima etapa, refrigeração, é outro ponto crítico que os espermatozoides são submetidos durante a criopreservação, pois nesta fase exige uma maior capacidade em adaptar-se as zonas intermediárias de temperaturas, entre +19 °C e +8 °C (MORAN, 1992), podendo sofrer lesões severas (MAZUR, 1984). A membrana plasmática é a estrutura mais susceptível aos danos sofridos pelos espermatozoides durante a criopreservação (BORGES et al., 2011), sendo sua integridade o parâmetro mais comumente afetado no processamento (ÁVILA-PORTILLO et al., 2006; ARRUDA et al., 2007), o que induz a grandes impactos na habilidade fertilizante do espermatozoide (BORGES et al., 2011).

Considerando que as células espermáticas não estão adaptadas às variações de temperatura decorrentes ao processo de criopreservação (HOLT, 2000a), danos químicos e físicos ocorrem às membranas (extra e intracelulares), resultando em alterações de fase de transição lipídica (PURDY, 2006), caracterizada pela mudança de sua estrutura do estado líquido cristalino para o estado gel (CANISSO et al., 2008; BORGES et al., 2011) decorrente dos rearranjos ocasionados nos fosfolipídeos (GRAHAM, 1996; ARRUDA et al., 2010).

Ressalta-se que é durante o período de resfriamento (20°C e 5°C) que ocorrem mudanças irreversíveis à membrana plasmática, devido à ruptura e perda de seus arranjos celulares (WATSON, 1995). Observa-se ainda um rearranjo nas cadeias de ácidos graxos. Inicialmente ordenados de forma aleatória, passam a ordenar-se paralelamente, resultando em estrutura rígida, susceptível a rupturas, fusões e com perda da permeabilidade iônica seletiva (AMANN e PICKET 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995; HOLT, 2000a). No entanto, Chakrabarty et al. (2007) não relacionaram estas mudanças ocasionadas a membrana plasmática somente a mudança na fase de transição lipídica, mas também em diferenças composicionais na membrana espermática.

Em relação aos efeitos da criopreservação, especificamente a refrigeração, Watson (2000) destacou o choque térmico como ponto crítico, ocasionando mudanças bioquímicas e funcionais nos espermatozoides, assim como a irreversível redução da motilidade espermática. Outros danos relacionados a refrigeração também foram descritos, como disfunção mitocondrial (AURICH, 2005) e anormalidades flagelares (O'CONNELL et al., 2002). De acordo com Holt (2000b) e Salamon e Maxwell (2000), a utilização de curvas lentas de refrigeração é uma forma de minimizar a ocorrência do choque térmico, uma vez que HOLT (2000a) e WATSON, (2000) relacionaram os efeitos deletérios do choque térmico aos danos ocorridos às membranas espermáticas durante a fase de transição lipídica da membrana espermática.

O controle da taxa de resfriamento é de suma importância para criopreservação, uma vez que curvas muito lentas induzem o efeito solução, onde os espermatozoides são expostos a elevados níveis de solutos, decorrente da desidratação excessiva (FAHY, 1980; WATSON, 1995). Inversamente, se a curva for muito rápida, não haverá tempo para que ocorra a desidratação dos espermatozoides, possibilitando a formação de cristais de gelo intracelular, causando lesões estruturais prejudicial à célula (MAZUR, 1984; WATSON, 1995), ambos agindo de forma deletéria a função espermática (WATSON, 1995).

Mesmo após todos os desafios que a célula espermática é submetida durante a criopreservação, a etapa subsequente – descongelamento – também deve ser observada, pois objetiva-se a inversão das mudanças reversíveis ocasionadas as células espermáticas durante a criopreservação (HOLT et al., 1992). Para isso, é imprescindível que a mesma seja realizada na mesma intensidade do processo de criopreservação (lenta ou rápida) (PURDY, 2006; SILVA, 2010), de modo que, se a curva de congelamento foi lenta, a descongelamento também deverá ser lenta, permitindo que ocorra a diluição dos solutos e reidratação das células (ARRUDA et al.,

2010), e se a criopreservação foi rápida, o sêmen deverá ser descongelado rapidamente, visando evitar a recristalização do gelo formado durante a congelamento (HOLT, 2000a).

3.7. Testes laboratoriais para avaliação espermática

A análise espermática realizada através de métodos convencionais como a microscopia de luz, tem sido um fator limitante as pesquisas, pois é influenciada por diferentes fatores, como o observador e o tempo necessário na preparação e análise das amostras relativamente alto, uma vez que resultam em um número reduzido de espermatozoides avaliados (BATISTA e GUERRA, 2010). Junto ao avanço das pesquisas, diversas biotécnicas vem sendo desenvolvidas e implantadas para avaliação seminal, visando a obtenção de resultados com maior acurácia e permitindo uma maior repetibilidade, das quais se destaca o sistema computadorizado de avaliação espermática (CASA) que permite uma análise da motilidade e cinemática espermática e a citometria de fluxo uma avaliação funcional destas células.

3.7.1 Sistema computadorizado de avaliação espermática – CASA

O uso de técnicas automatizadas para avaliação de parâmetros como a motilidade e cinemática espermática é de suma importância, pois é através destas em que avaliamos a capacidade fertilizante da célula (ARRUDA et al., 2007). No entanto, estudos demonstram que não somente estas variáveis estão relacionadas à capacidade dos espermatozoides em fertilizar, também, os elevados percentuais de alterações morfológicas (VERSTEGEN, et al., 2002).

O sistema CASA é um método de análise da motilidade e cinemática espermática, desenvolvido de forma a reduzir a subjetividade das avaliações (GALLEGO, 2010) das análises seminais convencionais (VERSTEGEN, et al., 2002; AMANN e KATZ, 2004), aumentando a confiabilidade e repetibilidade das mesmas (ARRUDA et al., 2000; MATOS et al., 2008). Mesmo sendo a motilidade gerada a partir do movimento flagelar, os dados são obtidos por este sistema por meio do monitoramento do movimento de cabeça dos espermatozoides, uma vez que, a mesma não se movimenta de forma tão rápida quando comparada ao flagelo, permitindo uma melhor captura de imagens (MORTIMER, 2000; AMANN e KATZ, 2004).

Segundo Mortimer (1997) a análise seminal realizada através do sistema CASA, permite a obtenção de diferentes parâmetros celulares como: motilidade total (MT) obtida

através da razão das células móveis sobre o número total de células avaliadas, e parâmetros cinéticos como a motilidade progressiva (MP) representada pelas células que apresentam movimentos progressivos sobre o número total de células avaliadas, linearidade (LIN) que é a medida do afastamento da célula numa trajetória em linha reta e retilinearidade (STR) que é a medida do afastamento da trajetória considerando em linha reta, todos expressos em porcentagem (%).

Outros parâmetros cinéticos adquiridos a partir da análise no CASA são: velocidade curvilínea (VCL) que refere-se a distância percorrida de modo curvilíneo pelas células espermáticas, obtida através do somatório das distâncias ao longo da trajetória corrigida pelo tempo, velocidade em linha reta (VSL) que é a distância percorrida em linha reta entre o ponto inicial e final da trajetória dividido pelo tempo em que realizou-se este trajeto e velocidade média do percurso (VAP) relacionado a velocidade de forma ininterrupta do caminho da célula, sendo este, indicativo do comprimento da trajetória geral dos espermatozoides, estes expressos em $\mu\text{m/s}$. Já a frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), expressa em Hertz, é a frequência com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular independente de direção enquanto a amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH), expressa em micrômetros que corresponde a largura média da oscilação da cabeça durante o deslocamento. No entanto, mesmo com o uso rotineiro deste sistema e diante das vantagens apresentadas, alguns fatores limitam a utilização deste método, ressaltando o alto custo para aquisição do equipamento e as variações morfológicas entre espécies (AMANN e KATZ, 2004; PESCH e BERGMANN, 2006).

3.7.2 Citometria de Fluxo

O uso de sondas fluorescentes para análise espermática através da microscopia de fluorescência apresenta-se como um método eficaz utilizado rotineiramente, no entanto, o número de células analisadas (em média 200 células) por esta técnica é muito reduzido, tornando-se um ponto crítico para avaliação espermática (ARRUDA et al., 2007). A citometria de fluxo apresenta-se de forma vantajosa sobre as demais técnicas utilizadas para a avaliação espermática, pois, permite analisar maior número de espermatozoides (até 10.000) em menos de um minuto, de forma a fornecer resultados com maior exatidão (ARRUDA, 2000).

Esta é uma técnica de análise objetiva, que permite trabalhar com volumes reduzidos de amostras e maior repetibilidade experimental (GILLAN et al., 2005), fornecendo dados de

análises de características, como tamanho, forma e complexidade celular, assim como, função de componentes espermáticos (GRAHAM, 2001; GILLAN et al., 2005).

Inicialmente utilizada na mensuração do conteúdo de DNA das células espermáticas (EVENSON et al., 1980), hoje aplica-se a citometria de fluxo para avaliação de diferentes características nos espermatozoides, como a viabilidade celular, integridade acrossomal, atividade mitocondrial, status de capacitação espermática, fluidez da membrana e análise do DNA (GILLAN et al., 2005), sendo a cada dia mais empregada na avaliação das características espermáticas de diferentes espécies de mamíferos (EVENSON, 1980; GARNER e JOHNSON, 1995).

Diferentes fluorocromos tem sido utilizados, em conjunto a citometria de fluxo, para analisar viabilidade dos espermatozoides (GARNER e JOHNSON, 1995; GRAHAM et al., 1990; PAPAIOANNOU et al., 1997), seja por análises individuais ou múltiplas, a partir da associação dos mesmos (GILLAN et al., 2005; ARRUDA et al., 2007), fornecendo o real estado das estruturas celulares (CELEGHINI et al., 2007) de forma a determinar a integridade e viabilidade celular (GRAHAM 1999; ASSUMPCÃO et al., 2003).

3.7.2.1 Análise da integridade de membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática é um parâmetro a ser analisado através do uso de sondas fluorescentes não penetrantes diante de membranas íntegras (AURICH, 2005; SILVA e GADELLA, 2006).

Dentre vários fluorocromos utilizados para analisar a integridade de membrana destacam-se o Hoechst 33258 (McLAUGHLIN et al., 1992; HINSCH et al., 1997; ESTEVES et al., 2000), YoPro-1 (HARRISON et al., 1996; MARTIN et al., 2004) e iodeto de propídeo (IP) (PINTADO et al., 2000; AURICH, 2005; SINGH, 2006), os quais apresentam afinidade ao DNA celular, penetrando e emitindo fluorescência azul, verde e vermelho, respectivamente, somente em células com membrana plasmática danificada (SILVA et al., 2009).

No entanto, o uso do iodeto de propídeo vem se destacando nas pesquisas, devido a sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana plasmática (MURADAS et al., 2013).

3.7.2.2 Análise da integridade da membrana acrossomal

Associada a capacidade fertilizante dos espermatozoides (CARREIRA e CARREIRA, 2008), a reação acrossomal é caracterizada pela fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa, exteriorizando as enzimas acrossomais, permitindo a penetração dos espermatozoides à zona pelúcida do ovócito (FLESCHE e GADELLA, 2000).

Assim, é de suma importância a avaliação da integridade da membrana acrossomal, que, de acordo com Herrera et al.(2002), é comumente realizada a partir da associação da sonda fluorescente Isotiocianato de fluoresceína (FITC) a lectinas, como: *Peanut Agglutinin* (FITC-PNA) e *Pisum Sativum Agglutinin* (FITC-PSA). Estas lectinas se ligam a conteúdos acrossomais através da interação com glicoconjugados exclusivamente localizados na membrana acrossomal externa (FITC-PNA) ou com grupos sacarídeos da glicoproteína pró-acrosina (FITC-PSA) (GILLAN et al., 2005; SILVA e GADELLA, 2006).

Quando utilizado o FITC-PSA, os espermatozoides que possuem integridade acrossomal não são corados, uma vez que a não emissão de fluorescência é devido a incapacidade de penetração desta sonda na membrana acrossomal íntegra (GRAHAM, 2001), inversamente, caso presente acrossoma lesado, o FITC-PSA em contato com o conteúdo acrossomal, se liga a α -manose e a α -galactose da matriz acrossomal (GRAHAM, 2001) emitindo fluorescência verde amarelado (ARRUDA et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007).

Já o FITC-PNA, se liga β -galactose que associa-se à pequena porção da membrana acrossomal externa (GRAHAM, 2001) em espermatozoides que apresentam acrossoma intacto, emitindo fluorescência verde brilhante (ROTH et al., 1998). Caso o acrossoma apresente-se reagido, este fluorocromo irá se ligar a β -galactose somente nas áreas não lesadas da membrana acrossomal, corando apenas a região equatorial da cabeça ou não corando toda a extensão da mesma em verde fluorescente (ROTH et al., 1998).

3.7.2.3 Análise da atividade mitocondrial

Influenciada pelo potencial de membrana mitocondrial, a síntese de ATP exerce suma importância sobre os batimentos flagelares, consequentemente motilidade espermática (COSSON, 1996; CELEGHINI, 2005). Para o monitoramento do potencial de membrana mitocondrial, o uso de sondas fluorescentes vem sendo enfatizado em vários estudos, sendo as rodaminas (Rodamina 123) e o Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina (JC-1) os mais utilizados (CELEGHINI, 2005).

A rodamina 123 (R123) é o fluorocromo capaz de corar a mitocôndrias em células vivas (BENEL et al., 1986), utilizado para marcar células com mitocôndrias funcionais (GRAHAM et al., 1990). Porém, estudos mostraram que a R123 é capaz de identificar somente a função mitocondrial da célula, sendo incapaz de identificar o alto do baixo potencial de membrana mitocondrial (SALVIOLI et al., 1997).

Já o JC-1, é o fluorocromo mais utilizados para análise do potencial de membrana mitocondrial, uma vez que, além de corar as mitocôndrias funcionais, este, apresenta a capacidade em analisar os níveis de funcionalidade das mesmas (GRAHAM e MOCÉ, 2005). O JC-1, atua de forma a depender do gradiente eletroquímico da célula, sendo necessário um potencial de membrana mitocondrial negativo para penetrar na organela, assim emitir a fluorescência de acordo com sua concentração final, variando de verde a vermelho (ARRUDA et al., 2007). Esta variação na fluorescência é caracterizada de maneira que, quando fluoresce em verde, encontra-se em baixas concentrações, permanecendo em seu estado monomérico, e quando em vermelho, apresenta-se em altas concentrações formando J-agregados (ARRUDA et al., 2007).

3.7.2.4 Análise da estabilidade de membrana

O uso da sonda fluorescente Merocyanine 540 (M540) é indicado para análise da estabilidade da membrana plasmática, uma vez que, este fluorocromo hidrofóbico apresenta tropismo elevado por lipídeos presentes nas membranas desorganizadas (desestabilizadas) (HARRISON et al., 1996; GADELLA e HARRISON, 2000). Em membranas estabilizadas, os fosfolipídios permanecem no folheto interno da bicamada lipídica (BORGES et al., 2011), no entanto, durante a desestabilização da membrana, ocorre a externalização desses fosfolipídios, permitindo a ligação com a M540 (HALLAP et al., 2006), assim, emitindo uma fluorescência laranja e sua intensidade varia de acordo com a desordem lipídica da membrana (GADELLA e HARRISON, 2000).

A associação desta sonda com o Yo-Pro-1 é indicada não somente para avaliação da estabilidade da membrana plasmática, também a viabilidade espermática (HALLAP et al., 2006).

REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P.; PICKET, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea And Febiger, p. 715-745, 1993.
- AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, n. 3, p. 317-325, 2004.
- AMELAR, R. D.; DUBIN, L.; SCHOENFELD, C. Y. Sperm motility. **Fertil. Steril.**, v. 34, p.197-215, 1980.
- AMORIM, E. A. M. **Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen**. 2008. 194 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- APELL, H. J. How do P-Type ATPases transport ions? **Bioelectrochemistry**, v. 63, p. 149 – 156, 2004.
- ASSUMPCÃO, M. E. O. D. A. et al. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.39, n.3, p.149-156, 2002.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000.121f. Tese (Livre Docência). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2000.
- ARRUDA, R. P. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v,31, p.8-16, 2007.
- ARRUDA, R. P. et al. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade Bull sperm morphology: interpretation and impact on fertility. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 47-60, 2015.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.
- AUSTIN, C. R. Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. **Aust. J. Sci. Res.**, v.4, p. 581-596, 1951.
- ÁVILA-PORTILLO, L.M. et al. Fundamentos de criopreservación. **Rev. Colomb. Obst. Ginecol.**, v.57, p.291-300, 2006.

- AXELSEN, K. B.; PALMGREN, M. G. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. **J. Mol. Evol.**, v. 46, p. 84–101, 1998.
- BACCETTI, B.; AFZELIUS, B. A. The Biology of the Sperm Cell. **Monographs in Developmental Biology**, v.10, New York: S. Karger, 1976.
- BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P.G. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, p.125-132, 2010.
- BEDFORD, J. M.; HOSKINS, D. D. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. In: **Marshall's Physiology of Reproduction**. p. 379–568, 1990.
- BENEL, L. et al. Mitochondrial uptake of rhodamine 123 by rabbit articular chondrocytes. **Cytometry**, v. 7, p. 281 – 285, 1986.
- BORGES et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.35, p.303-324, 2011.
- BLANCO, G.; MERCER, R.W. Isozymes of the Na⁺,K⁺-ATPase: heterogeneity in structure,diversity in function. **American Journal of Physiology**, v. 275, p. 633–650, 1998.
- BLANCO, G.; MELTON, R. J.; SANCHEZ, G.; MERCER, R. W. Functional Characterization of a testes-specific alpha-subunit isoform of the sodium/potassiumadenosinetriphosphatase. **Biochemistry**, v. 38, p.13661–13669, 1999.
- BLANCO, G. et al. The alpha4 isoform of the Na,K-ATPase is expressed in the germ cells ofthe testes. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 48, p. 1023–1032, 2000.
- BLANCO, G. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ionregulation. **Seminars in Nephrology** v.25, p. 292–303, 2005a.
- BLANCO, G. The NA/K-ATPase and its isozymes: what we have learned using the baculovirus expression system. **Frontiers in Bioscience**, v.10, p.2397–2411, 2005b.
- BOATMAN, D. E.; ROBBINS, R. S. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. **Biol. Reprod.**, v. 44, p. 806-813, 1991.
- BORGES, J.C. et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitosdo oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.
- BREITBART, H.; NAOR, Z. Protein kinases in mammalian aperm capacitation and theacrosome reaction. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 151-159, 1999.
- BREWER L.; CORZETT, M.; BALHOM, R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 38895–38900, 2002.

- BUBLITZ, M. et al. P-type ATPases at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, p. 2515-2519, 2011.
- CANISSO, I.F. et al. Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*). **Ver. Investig. Vet. Perú.**, v.19, p.113-125, 2008.
- CARREIRA, J. T. **Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, potencial mitocondrial, cromatina e produção de embriões *in vitro* de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal.** 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, SP, Brasil, 2008.
- CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação dosêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.
- CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2005.
- CELEGHINI, E.C.C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reprod. Domest. Anim.**, v.42, p.479-488, 2007.
- CHAKRABARTY, J. et al. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, v.54, p.27-35, 2007.
- CHEN, Y. et al. Regulation of the $\alpha 1$ Na/K-ATPase expression by cholesterol. **J. Biol. Chem.** p.517–524, 2011.
- CHERNIAVSKY-LEV, M. et al. Ouabain-induced internalization and lysosomal degradation of the Na⁺/K⁺-ATPase. **J. Biol. Chem.**, p. 1049–1059, 2014.
- Cornelius, F. et al. General and specific lipid-protein interaction in Na,K-ATPase. **Biochim. Biophys. Acta**, p.1729–1743, 2015.
- COOPER, G. M. A célula: uma abordagem molecular. In: DE ROBERTIS, E. D. P.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- CORREIA, A.A.D.; CORREIA, J.H.R.D. **Bioquímica animal.** 2^a Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1985. 1223p.
- COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v. 20, n. 2, p. 83-94, 1996.

- CURRY, M. R.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. **Biol. Reprod.**, V.51, p. 1014-1021, 1994.
- CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 32, n.2, p. 93-99, 2008.
- CÂMARA, D. R.; KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Role of the Na⁺/K⁺-ATPase ion pump in male reproduction and embryo development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 1457-1467, 2017.
- DADOUNE, J. P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. **Microsc. Res. Tech.**, v. 61, p. 56-75, 2003.
- DARSZON, A. et al. Ion channels in sperm physiology. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 481–510, 1999.
- DARSZON, A. et al. Ion channels in sperm motility and capacitation. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 65, p. 229-244, 2007.
- DE LAMIRANDE, E.; LECLERC, P. GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. **Mol. Hum. Reprod.** v. 3, p. 175 – 194, 1997.
- EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. in: E. Knobil, J.D. Neill (Eds.), **The Physiology of Reproduction**, p. 29-77, 1994.
- ESTEVEZ, S.C. et al. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. **Human Reproduction**, v.15, p.2173-2179, 2000.
- EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131–1133, 1980.
- FAHY, G.M. Analysis of “solution effects” injury. Equations for calculating phase diagram information of the ternary system NaCl–dimethylsulfoxide–water and NaCl–glycerol–water. **Biophysical Journal**, v. 32, n. 2, p. 837–850, 1980.
- 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.
- FLORMAN, H. M. et al. An adhesion associated agonist from the zona pellucida activates G protein-promoted elevations of internal Ca²⁺ and pH that mediate mammalian sperm macroosomal exocytosis **Developmental Biology**, v.135, p.133-146, 1992.
- FOUQUET, J. P.; KANN, M. L. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. **Biol. Cell**. v.81, p. 89-93, 1994.

- FRASER, L. R.; UMAR, G.; SAYED, S. Na⁺-requiring mechanisms modulate capacitation and acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. **Journal of Reproduction and fertility**, v.97, p. 539-549, 1993.
- GADELLA, B.M.; HARRISON, L.A. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasmamembrane. **Development**, v. 127, p. 2407-2420, 2000.
- GADELLA, B. M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 229 - 236, 2008.
- GALLEGO, O. et al. A systematic screen for protein-lipid interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Systems Biology**, v. 6 p.430, 2010.
- GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **Biol. Reprod.**, v.53, p.276-284, 1995.
- GHEORGHIADÉ, M.; PITT, B. Digitalis Investigation Group (DIAG) trial: a stimulus for further research. **Am. Heart J.**, v. 134, p. 3–12, 1997.
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445–457, 2005.
- GLANDER, H.J.; SCHALLER, J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. **Mol. Hum. Reprod.**, v.5, p.109–115, 1999.
- GUR Y, BREITBART H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. **Genes Dev**, p.411–6, 2006.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biol. Reprod.**, v.43, p.55-64, 1990.
- GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practices**, v. 12, p. 119–130, 1996.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p.55-64, 1999.
- GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**. v. 68, p. 239-247, 2001.
- GRAHAM, J. K.; MOCEĆ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 492-504, 2005.

- GRAVANCE, C.G. et al. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, p. 1691-1703, 2000.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª Ed. São Paulo: Manole, 2004.
- HALLAP. T. et al. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 65, p.1122-1136, 2006.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, n. 11, p. 73 – 88, 1990.
- HARKEMA, W. et al. Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of the intact boarspermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. **Biol. Reprod.**, v.58, p.421-430, 1998
- HARRISON, R.A.P.; ASHWORTH, P.J.C.; AND MILLER, N.G.A. Bicarbonate/CO₂, an Effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boarsperm plasma membranes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.45, p.378–391, 1996.
- HINSCH, E. et al. A new combined *in vitro* test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. *Human Reproduction*, v.12, p.1673-1681, 1997.
- HERRERA J. et al. Acrosome reaction infertile and subfertile boar sperm. **Arch. Androl.**,v.48, p.133-139, 2002.
- HICKEY, K. D.; BUHR, M. M. Lipid bilayer composition affects transmembrane protein orientation and function. **J. Lipids**, 2011
- HOLT, W. V.; NORTH, R.D. Determination of lipid composition and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from ram spermatozoa. **J.Reprod. Fertil.** v.73, p.285–294, 1985.
- HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ramspermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biol Reprod**, v.46, p.1086-1094, 1992.
- HOLT, W. V. Basic aspects on frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**.V.62, p.3-22, 2000a.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000b.
- JIMENEZ, T. et al. Activity of the Na, K-ATPase α 4 isoform is important for membrane potential, intracellular Ca²⁺, and pH to maintain motility in rat spermatozoa. **Reproduction**, v. 139, p. 835-845, 2010.

- JIMENEZ, T. et al. Na,KATPase Alpha4 isoform is essential for sperm fertility. **Proc. Natl.Acad. Sci.**, v.108, p.644-649, 2011b.
- JIMENEZ, T. et al. Increased expression of the Na,K-ATPase alpha4 isoform enhances sperm motility in transgenic mice. **Biol. Reprod.**, v. 84, p. 153-161, 2011b.
- JIMENEZ, T. A. **The Na,K-ATPase α 4 isoform: mechanisms of action, regulation and relevance to male fertility**. 2011. 139f. Tese (Doutorado). Universidade do Kansas, 2011.
- JIMENEZ, T.; SANCHEZ, G.; BLANCO, G. Activity of the Na,K-ATPase α 4 Isoform Is Regulated during sperm capacitation to support sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 5, p. 1047 – 1057, 2012.
- JORGENSEN, P. L.; HAKANSSON, K. O.; KARLISH, S. J. Structure and mechanism of Na,K ATPase: functional sites and their interactions. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 65, p.817–849,2003.
- KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na⁺,K⁺-ATPase. **Annu. Rev. Biochem.**,71,p. 511–535,2002.
- KONRAD, L. et al. Cardiogenic steroids trigger non-classical testosterone signaling in Sertolice cells via the α 4 isoform of the sodium pump. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1813, p.2118-2124, 2011.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 838p.
- LENZI, A. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction**. v. 2, n. 3 p. 246–256, 1996.
- LINGREL, J. B.; KUNTZWEILER, T. Na_p,K_p-ATPase. **J. Biol. Chem.** v. 269, 19 p. 659–662, 1994.
- LIMA, L. F. **Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do semen ovino criopreservado em palhetas**. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil, 2008.
- LIU, et al. Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 27838–27844, 2000.
- LOSANO, J. D. A. et al. Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. **Reprod. Dom. Anim.** v. 52, p. 289–297, 2017.

- MANN, T.; LUTWAK – MANN, C. Male Reproductive Function and Semen, **Springer Berlin**, 1981.
- MCLAUGHLIN, E.A.; FORD, W. C.; HULL, M.G.. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 95, p.527–534, 1992.
- MARK, R. J. et al. Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca²⁺ homeostasis and cell death. **J. Neurosci.**, v.15, n. 9, p. 6239–6249, 1995.
- MARQUES, B.; SUAREZ, S. S. Different signalling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. **Biol. Reprod.** v. 70, p. 1626–1633, 2004.
- MATOS, D.I.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, L.G.; et al. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008
- MARTIN, G. et al. Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.71, p.28-37, 2004.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanism and implications. **American Journal of Physiology**, v. 247, p. C125 – C142, 1984.
- MCDERMOTT, J.P. et al. Green fluorescence protein driven by the Na,K-ATPase alpha4 isoform promoter is expressed only in male germ cells of mouse testis. **J. Assist. Reprod. Genet.** v.29, p.1313- 1325, 2012.
- McDermott J, Sanchez G, Nangia AK, Blanco G. Role of human Na,K-ATPase alpha 4 in sperm function, derived from studies in transgenic mice. *Mol Reprod Dev* 2015; 82:167–181.
- MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p. 327-344, 2002.
- MOGAS, M. T.; RIVERA, D.M.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Roles of Na⁺/K⁺-dependent ATPase, Na⁺/H⁺ antiporter and GLUT hexose transporters in the cryosurvival of dog spermatozoa: effects on viability, acrosome state and motile sperm subpopulation structure. **Theriogenology**, v. 75, p. 1669–1681, 2011.
- MOLINIA, F.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.34, p.491-500, 1994.
- MORAN, D. M. **effects of cooling rate and storage temperature on motion characteristics of stallion spermatozoa**. Fort Collins: Colorado State University, 1992.
- MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Hum. Reprod.**, v. 3, p. 403–439, 1997.

- MORTIMER, D. Sperm preparations methods. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 3, p. 357- 366, 2000.
- MORTIMER, S.T. CASA – Practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.
- MOTA FILHO, A. C. **Efeito da Adição de Dimetilformamida ao Diluente ACP-106 C Sobre as Características do Sêmen Canino Congelado**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Fortaleza, 2009.
- MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biol Reprod** . p.540–7, 2004.
- NAGY, S. et al. Changes in plasma membrane and acrossome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 225-235, 2004.
- Nascimento, J. M. t al. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. **Journal of Cellular Physiology** . p. 745–751, 2008.
- NASSAR et al. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. **Fertil. Steril.**, v. 71, p. 919-923, 1999.
- NEWTON, L. D. t al. Na⁺/K⁺ ATPase regulates sperm capacitation through a mechanism involving kinases and redistribution of its testis-specific isoform. **Mol. Reprod. Dev.** v. 77, p. 136–148, 2010.
- NAZ, R. K.; RAJESH, P. B. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrossome reaction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, 2004.
- O'CONNELL, M.; MCCLURE, M.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, p. 704– 779, 2002.
- OSHEROFF, J. E. et al. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 5, p. 1017-1026, 1999.
- PALMGREN, M.; NISSEN, P. P-Type ATPases. **Annu. Rev. Biophys.** v. 40, p. 243 – 266, 2011.

- PAPAIOANNOU, K. Z. et al. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v.48, p.299-312, 1997.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.
- PASUPULETI, V. **Role of glycolysis and respiration in sperm metabolism and motility**. 2007. 60 f. DISSERTAÇÃO (Mestrado em ciências biológicas) - Kent State University, College of Arts and Sciences. 2007.
- PEGG, D.E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n. 1, p. 05-14, 2002.
- PENG, M. et al. Partial inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by ouabain induces the Ca²⁺-dependent expression of early-response gene in cardiac myocytes. **J. Biol. Chem.** **271**, 10 p.372–10 378, 1996.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597-612, 2006.
- PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: Mckinnon AO. Voss JL (ed.). **Equine Reproduction**. p. 769-789, 1993.
- PINTADO, B.; DE LA FUENTE J.; ROLDAN, E. R. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **J. Reprod. Fertil.** v. 118, p.145–152, 2000.
- PUKAZHENTHI et al. Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zonapellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors. **Mol .Reprod. Dev.** v. 49, p. 48-57, 1998.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63. p.215-225, 2006.
- QUILL, T. A.; WANG, D.; GARBERS, D. L. Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSpers. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, p. 84–92, 2006.
- QUINN, P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. **Cryobiology**, v. 22, p.128–146, 1985.
- 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.

- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 77-111, 2000.
- SALVIOLI, S. et al. JC-1 but not DiOC₆ (3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. **Federation of European Biochemical societies Letters**, v. 411, p. 77 – 82, 1997.
- SANCHEZ, G. et al. The Na,KATPase alpha4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 12, p. 565–576, 2006.
- SANDTNER, W. et al. Ouabain binding site in a functioning Na⁺/K⁺-ATPase. **J. Biol. Chem.** v.38, p. 177–38, 2011.
- SCHONER, W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. **Eur. J. Biochem.**, v.269, p. 2440– 2448, 2002.
- SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. **American Journal of Physiology, Cell Physiology**, v. 293, n. 2, p. C509–C536, 2007.
- SCHNEEBERGER, E.E., LYNCH, R.D. The tight junction: a multifunctional complex. **Am. J. Physiol.: Cell. Physiol.**, v. 286, p. C1213–C1228, 2004.
- SCHUFFNER, A.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. **Hum. Reprod.**, v.16, p.2148–2153, 2001.
- SENGER, P. L. Spermatozoa in the female tract: transport, capacitation e fertilization. In: **Pathways to pregnancy and parturition**. 2^a Ed. Moscow: Current conceptions, Inc, Cap12, p. 266-283, 2003.
- SHAMRAJ, O. I.; LINGREL, J. B. A putative fourth Na⁺,K⁺-ATPase alpha subunit gene is expressed in testis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91 p. 12952–12956, 1994.
- SHINODA, T. et al. Crystal structure of the sodium–potassium pump at 2.4 resolution. **Nature**. v. 459, p. 446–450, 2009.
- SHUKLA, K. K.; MAHDI, A. A.; RAJENDER, S. Ion Channels in Sperm Physiology Review and Male Fertility and Infertility. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 5, 2012.
- SILVA, P. N. F.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 958-978, 2006.

- SILVA, S.V. et al. Diferentes Métodos e técnicas na avaliação espermática: uma breve revisão. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v.12, p.1-15, 2009.
- SILVA, S. V. **Avlição de espermatozoides ovino criopreservados em Tris-gema acrescido de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos**. 2010. 114 f. Tese (Doutoradoem Ciência Veteriária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.
- SINGER, J. S.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of the cell membranes. **Science**. v. 175. p. 720 – 731, 1972.
- SINGH, B.K. **Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda**. São Paulo: Andrei Editora , 2006. 331p.
- SIQUEIRA, J. B. **Relação da fertilidade do sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermatica “ In vivo”**. 2004. 91 f. Tese (mestrado em medicina veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- SMITH, T. T. et al. Changes in lipid diffusibility in the hamster sperm head plasma membrane during capacitation in vivo and in vitro. **Mol Reprod Dev** .50:86–92, 1998.
- SNOECK, P.P.das N. **Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade**. 2003, 116p. Tese (Doutorado em MedicinaVeterinária). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.2003.
- SOUSA, D.B.; BICUDO, S.D. Inseminação artificial com sêmen ovino refrigerado por 24 horas e transportado no sistema Equitainer®. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n. 3, p. 330-332, 2003.
- SUHAIL, M. Na⁺,K⁺-ATPase: ubiquitous multifunctional transmembrane protein and its relevance to various pathophysiological conditions. **J. Clin. Med.Res.**, v. 2, p. 1-17, 2010.
- SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G. **The sperm cell: Production, Maturation,Fertilization, Regeneration**. Minneapolis: Cambrige, 2006. 372 p.
- TANNO, P. H. **Estudo das alterações morfo-funcionais de espermatozoides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo**. 2009. 19f. Dissertação (mestrado em medicina veterinaria). Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. 2009.
- TAPIA, J. A. et al. The Membrane of the Mammalian Spermatozoa: Much More Than an Inert Envelope. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 47, p. 65–75, 2012.
- THERIEN, A.G.; R. BLOSTEIN, Mechanisms of sodium pump regulation. **Am J Physiol Cell Physiol**, p. C541-66, 2000.

- THOMAS, R.; GRAY, P.; ANDREWS, J. Digitalis: its mode of action, receptor and structure-activity relationships. **Adv. Drug. Res.**, v. 19, p. 311–562, 1990.
- THOMPSON, T.E. Lipids. **Current Opinion In Structural Biology**. v.3, p. 473–474, 1993.
- THUNDATHIL, J. C.; ANZAR, M.; BUHR, M. M. Na⁺ /K⁺ ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation. **Biology Reproduction**. v. 75, p. 308-317, 2006.
- THUNDATHILL, J. C. et al. The Effects of Increased Testicular Temperature on Testis-Specific Isoform of Na⁺/K⁺-ATPase in Sperm and its Role in Spermatogenesis and Sperm Function. **Reprod. Dom. Anim**. v. 47, P. 170–177 , 2012.
- TIAN, J.; XIE, Z.J. The Na-K-ATPase and calcium-signaling microdomains. **Physiology**, v. 23, 2008.
- TRALDI, A. S. **Tópicos em reprodução e inseminação artificial em caprinos**. In: Manual Técnico. São Paulo, 1994. 54p.
- TRAVIS, A. J. et al. Targeting of a Germ Cell-specific Type 1 Hexokinase Lacking a Porin-binding Domain to the Mitochondria as Well as to the Head and Fibrous Sheath of Murine Spermatozoa. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, p. 263–276, 1998.
- TREVISI, L. et al. Antiapoptotic effect of ouabain on human umbilical vein endothelial cells, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 321, n. 3, p. 716–721, 2004.
- UNDERHILL, D. A. et al. The Na⁺,K⁺-ATPase alpha4 gene (Atp1a4) encodes a ouabain resistant alpha subunit and is tightly linked to the alpha2 gene (Atp1a2) on mouse chromosome 1. **Biochemistry**, v. 38, p.14746–14751, 1999.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research nd veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-157, 2002.
- VISCONTI, P. E. et al. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. **Development**, v. 121, p. 1139–1150, 1995.
- WAGONER, K. et al. Different expression and activity of the alpha1 and alpha4 isoforms of the Na/KATPase during rat male germ cell ontogeny. **Reproduction**, v. 130, p.627-641, 2005.
- WASSALL, S. R.; STILWELL, W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1788, p. 24-32, 2009.
- WASSARMAN, P. M. Sperm receptors and fertilization in mammals. **Mt. Sinai. J. Med.**, v. 69, n. 3, p. 148–155, 2002.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p. 871-891, 1995.

- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved sêmen. **Animal Reproduction Science**. v. 6, p. 481 – 492, 2000.
- WOO, A. L.; JAMES, P. F.; LINGREL, J. B. Characterization of the fourth alpha isoform of the Na,K-ATPase. **J. Membr. Biol.**, v. 169, p. 39–44, 1999.
- WOO, A. L.; JAMES, P. F.; LINGREL, J. B. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na⁺,K⁺-ATPase. **The Journal Biology Chemistry**, v. 275, n. 27, p.20693-20699, 2000.
- YANAGIMACHI, R.1994: Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York, pp. 189–317, 1994.
- ZAFFALON, F. G. **Alterações semelhantes a capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja**. 2009.95f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2009.
- ZENG, Y.; OBERDORF, J. A.; FLORMAN, H. M. pH regulation in mouse sperm: identification of Na⁺-, Cl⁻, and HCO₃⁻ dependent and arylaminobenzoate dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. **Dev. Biol.**v. 173, p. 510–520, 1996.

ARTIGO: Localização da Na^+, K^+ -ATPase em espermatozoides de ovinos *in natura*, pós descongelamento e capacitados *in vitro* e determinação dos efeitos de seu bloqueio sobre as características espermáticas.

AS Oliveira¹, MMP Guerra¹, DR Câmara², AM Batista¹, RAJ Silva¹, LCP Arruda¹, MM Monteiro¹, JAS Costa³

¹Laboratório de Andrologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; ²Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal de Alagoas, Viçosa, AL, Brasil; ³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

Resumo

Objetivou-se com este estudo localizar a Na^+, K^+ -ATPase em espermatozoides ovinos *in natura*, pós descongelamento e capacitados *in vitro*, além de avaliar a influência do bloqueio desta proteína sobre os parâmetros cinemáticos e aspectos funcionais. Exp.1: amostras de sêmen foram colhidas e diluídas em Tris-gema de ovo (200×10^6 espermatozoides/mL) e congeladas; Exp. 2: os ejaculados foram coletados, diluídas em meio TALPm e alíquotadas para indução da capacitação *in vitro* (adição de soro de ovelha em estro) ou o bloqueio da Na^+, K^+ -ATPase com ouabaína (10^{-4} M). Alíquotas de sêmen de ambos os experimentos foram analisadas quanto a cinemática (CASA), e por meio da citometria de fluxo, avaliando a localização da Na^+, K^+ -ATPase, integridade de membrana plasmática (IP) e acrossomal (FITC-PNA), viabilidade e estabilidade de membrana (YO-PRO e M540), e, no Exp. 2 além das análises supracitadas realizou-se também a avaliação do potencial de membrana mitocondrial (JC-1) após 0 h e 3 h de incubação. Independente da amostra (*in natura*, pós descongelamento e capacitados *in vitro*), a localização da Na^+, K^+ -ATPase manteve-se na peça intermediária dos espermatozoides. A criopreservação ocasionou uma redução ($P > 0,05$) nos parâmetros de MT, MP e VAP, além de aumento no BCF. Redução ($P > 0,05$) no percentual de células com membranas plasmáticas e acrossomal íntegras e membranas estáveis foi também observado. Exp. 2: O bloqueio da Na^+, K^+ -ATPase, reduziu ($P < 0,05$) MP, VCL e VSL ao longo da incubação, enquanto no grupo controle observou-se uma redução ($P < 0,05$) da MT, VCL e ALH. No momento 0h, a VAP no grupo tratado foi inferior ($P < 0,05$) ao grupo controle, sendo que após 3h essa diferença foi observada para VAP e VSL. A indução da capacitação não gerou diferenças ($P > 0,05$) no parâmetros cinemáticos e funcionais quando comparado ao grupo controle, todavia observou-se ao longo da incubação um aumento ($P > 0,05$) no percentual de células com membrana plasmática lesionadas, acrossomal íntegra sem marcação da Na^+, K^+ -ATPase. Inversamente, ocorreu uma redução ($P > 0,05$) no número de células com membrana acrossomal reagida, plasmática íntegras não marcadas com Bodipy Fl Ouabaína. Assim, conclui-se que a localização da Na^+, K^+ -ATPase não se altera em espermatozoides ovinos com diferentes *status* fisiológico (*in natura*, pós descongelamento e capacitados *in vitro*) e que o bloqueio da Na^+, K^+ -ATPase induz pouca influência na cinemática de espermatozoides ovinos.

Palavras-chave: bomba de sódio, canal iônico, carneiro, sêmen.

Abstract

The aim of this study was to localize the Na^+ , K^+ -ATPase in raw, post-thaw and *in vitro* capacitated ram sperm, as well as to evaluate the influence of Na^+ , K^+ -ATPase blocking on kinematic and functional sperm parameters. Exp.1: semen samples were harvested, diluted in Tris-egg yolk (200×10^6 sperm/mL) and frozen; Exp. 2: obtained ejaculates were diluted in TALPm and aliquoted to induce *in vitro* capacitation (addition of estrous sheep serum) or to block Na^+ , K^+ -ATPase with ouabain (10^{-4} M). Semen aliquots from both experiments were subjected to kinematic (CASA) evaluation and, with aid of flow cytometry, were analyzed Na^+ , K^+ -ATPase localization, plasma (IP) and acrossomal membrane (FITCPNA) integrity, membrane viability and stability (YO-PRO and M540) and, on Exp. 2, plus abovementioned analysis was also detected the mitochondrial membrane potential (JC-1) after 0 and 3 h of incubation. Regardless the sample status (raw, post-thaw and *in vitro* capacitated), the Na^+ , K^+ ATPase localization remained on sperm middle piece. The cryopreservation reduced ($P>0.05$) MT, MP and VAP parameters, moreover increased BCF. Reduction ($P>0.05$) o percentage of sperm with membrane intact and stable or with intact acrosome was also detected. Exp. 2: Na^+ , K^+ -ATPase blocking reduced ($P<0.05$) MP, VCL and VSL throughout incubation, whereas on control group there was a reduction ($P < 0.05$) of MT, VCL and ALH. At 0 h, VAP on treated group was lesser ($P<0.05$) than control, but after 3 h differences were detected for both VAP and VSL. The capacitation induced no differences ($P>0.05$) on kinematic and functional parameters compared to control group, however throughout incubation there was an increase ($P>0.05$) on percentage of sperm with damaged plasma membrane, intact acrosome with no Na^+ , K^+ -ATPase staining. Conversely, there was a reduction ($P>0.05$) of sperm with reacted acrosome, intact plasma membrane and no Na^+ , K^+ -ATPase staining. It was concluded that no Na^+ , K^+ -ATPase staining localization does not change despite of ram sperm physiological status (raw, post-thaw, *in vitro* capacitated) and no Na^+ , K^+ -ATPase staining blocking induce slight influence on ram sperm kinematic.

Key words: sodium pump, ionic channel, ram, semen.

1. Introdução

A sódio-potássio-adenosina-trifosfatase (Na^+ , K^+ -ATPase) também conhecida por bomba de sódio, é uma proteína transmembranar integral, membro da família ATPases do tipo P, formada por dois polipeptídios, a subunidade catalítica α , com peso molecular de 112 kDa, e a regulatória β , com 55 kDa, sendo que, a α é formada por quatro tipos distintos ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$), enquanto a β por três ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$) (BLANCO e MERCER, 1998).

A Na^+ , K^+ -ATPase atua em diferentes processos celulares, como a geração do gradiente de Na^+ e K^+ através da membrana, essencial à fisiologia da célula (JORGENSEN et al., 2003), para o transporte de diferentes íons e substratos através da membrana, estabelecimento do

potencial de repouso e gradiente osmótico (LINGREL e KUNTZWEILER, 1994; BLANCO e MERCER, 1998).

Quanto ao padrão de distribuição e localização das subunidades α e β , estas se apresentam interligadas, de forma que, uma das quatro subunidades α se liga a uma das três subunidades β , dando origem as isoformas (CÂMARA et al., 2017). Por exemplo, as isoformas $\alpha 1\beta 1$ é expressa na maioria das células (MOBASHERI, et al., 2000) e $\alpha 4\beta 1$ está presente nas células espermáticas (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003), ressaltando que a $\alpha 4$ atua de forma responsiva pela maior parte do transporte ativo de Na^+ e K^+ através da membrana dos espermatozoides (WAGONER et al., 2005).

De forma seletiva, a inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase através da adição da ouabaína, resultou na diminuição da motilidade espermática em ratos (WOO et al., 2000), além de alterar o potencial de membrana plasmática, pH e níveis intracelulares de cálcio (JIMENEZ et al., 2010). Já em touros, pode-se observar uma redução da motilidade progressiva e indução da capacitação espermática, com modificação da distribuição da Na^+, K^+ -ATPase na cabeça do espermatozoide (THUNDATHIL et al., 2006).

Uma vez que na literatura não foram identificados relatos sobre a localização da Na^+, K^+ -ATPase em espermatozoides ovinos, e os estudos encontrados sobre a avaliação da influência desta proteína na cinemática espermática não foram realizados utilizando as novas técnicas de avaliação da qualidade espermática, esse estudo tem como objetivo pesquisar informações básicas e iniciais sobre a função e localização da Na^+, K^+ -ATPase em espermatozoides ovinos.

2 Material e Métodos

2.1. Reagentes e meios

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), com exceção do fluorocromo Bodipy® FL Ouabaína (BD-FL) e YO-PRO®-1 iodide (YO), que foram da Molecular Probes (Life Technologies, Eugene, USA) e do fosfato salino tamponado (PBS), da Gibco® (Life Technologies, EUA). Soluções estoques dos fluorocromos foram preparadas da seguinte maneira: BD-FL (116,45 μ M), Iodeto de Propídio (IP: 25 mg/mL), Merocianina M540 (54mM) e JC-1 (5 mg/ μ l) em DMSO (dimetilsulfóxido), FITC-conjugada ao Peanut aglutinina (FITC-PNA:1 mg/mL), YO-PRO (1mM) em PBS. As soluções de trabalho: BD-FL (10,01 μ M), IP (0,5 mg/mL), FITC-PNA (0,04 mg/mL), M540 (270 μ m) e YO (2,5 μ m) em PBS e JC-1 (3,06 μ m) em DMSO.

Para a diluição do sêmen *in natura* utilizado foi empregada a solução Tris tampão (3,605 g Tris; 2,204 g ácido cítrico; 1,488 g frutose; 100 mL de água MilliQ). Por sua vez, a criopreservação do sêmen foi feita com o diluidor Tris-gema de ovo (TGO), composto por 375 mM de Tris, 124 mM de ácido cítrico, 41,6 mM de frutose, 20% de gema de ovo, 5% de glicerol, 100 UI de penicilina e 50 mg de estreptomicina, ambos com pH 6,8.

Para a capacitação espermática *in vitro* utilizou-se o meio TALP (PARRISH et al. 1988), modificado por Leahy et al. (2016), composto por CaCl₂ (2 mM), KCl (3.1 mM), MgCl₂ (0.4 mM), NaCl (95 mM), NaH₂PO₄ (0.3 mM), HEPES (40 mM), lactato de sódio (21.6 mM), Glicose (5 mM), piruvato de sódio (1 mM), NaHCO₃ (15 mM), vermelho de fenol (0.03 mM) e BSA (3mg/ml), enriquecido com 2,5% de soro de ovelha em estro (SOE). Já para o bloqueio da Na⁺, K⁺-ATPase o meio utilizado foi o TALPm acrescido de ouabaína na concentração de 10⁻⁴ M.

Todas as soluções descritas acima foram armazenadas a -20 °C, exceto o meio TALP e a ouabaína que foram armazenados a 5°C.

2.2 Aspectos éticos

O presente estudo, envolvendo animais, foi conduzido mediante aprovação pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (licença nº 071/2017 CEUA/UFRPE).

2.3 Animais e colheita de sêmen

2.3.1 Experimento 1

Foram utilizados quatro ovinos da raça Santa Inês, em atividade reprodutiva, com histórico de fertilidade, alojados no biotério do Hospital Veterinário da UFRPE, e submetidos a manejo intensivo, dieta com feno de capim Tifton e 400g/dia de ração comercial, água e sal mineral *ad libitum*.

Durante o experimento, as colheitas foram realizadas em dias alternados, onde, realizou-se sete colheitas por animal, totalizando 28 ejaculados.

2.3.2 Experimento 2

Foram utilizados quatro ovinos da raça Dorper (n=2) e White Dorper (n=2), sexualmente maduros, com histórico de fertilidade, pertencentes a uma propriedade particular localizada no Município de Camaragibe-PE. Os animais eram submetidos a manejo intensivo, onde a dieta era de acordo com o manejo nutricional da propriedade. As colheitas de sêmen foram realizadas com intervalo de 48 horas, tendo sido realizadas cinco colheitas por animal, totalizando 20 ejaculados ao longo de todo o experimento.

Em ambos os experimentos os ejaculados foram obtidos por meio de vagina artificial utilizando uma fêmea como manequim.

Imediatamente após as colheitas, os ejaculados foram submetidos a avaliações subjetivas macroscópicas (volume, aspecto e cor) e microscópica (turbilhonamento ≥ 3 , vigor

≥ 3 e motilidade $\geq 70\%$), em microscópio de contraste de fase (Olympus, Japão; 100x). Em seguida a aprovação, formou-se um *pool* dos ejaculados (exp. 1 n=7; exp. 2 n=5) e cada *pool* foi submetido à análise de motilidade e concentração espermática por meio da contagem de células em Câmara de Neubauer (diluição 1:400).

2.4 Avaliação espermática

2.4.1 Avaliação da cinemática espermática

Para avaliação da cinemática, utilizou-se o sistema computadorizado de análise espermática (CASA, SCATM; Microptics, S.L., Versão 5.1, Barcelona, Espanha), onde, em cada amostra, uma alíquota (2,5 μ L) foi colocada em lâmina e coberta com lamínula ambas pré-aquecidas (37 °C), em seguida, foram avaliada em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japão, 100x). As imagens foram capturadas por meio de câmera de vídeo (Basler Vision TechnologiesTM A312FC, Alemanha).

Para cada amostra, cinco campos foram selecionados aleatoriamente com registro mínimo de 500 espermatozoides, onde foram avaliadas as seguintes variáveis: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), índice de oscilação ou wobble (WOB); velocidade curvilínea (VCL, μ m/s), velocidade em linha reta (VSL, μ m/s); velocidade média da trajetória (VAP, μ m/s), amplitude lateral da cabeça (ALH, μ m) e frequência de batimentos do flagelo (BCF, Hz).

2.4.2 Citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando o aparelho ImageStream[®] X, versão Mark II (Amnis, Seattle, WA, EUA), equipado com microscópio com objetiva de 60x, o tamanho das células foi 7 μ m e a velocidade do fluxo 44 mm/segundo. O software

INSPIRE® foi utilizado para a aquisição dos dados, e o IDEAS® (versão 6.0) para análise destas imagens.

Em todas as amostras, foram coletados 5000 eventos, onde os fluorocromos foram excitados por um laser de 488 nm, no entanto, a potência do laser para a associação FITCPNA+IP+BD-FL foi de 55 mW, YO-PRO + M540 foi 100.0 mW e JC-1 foi de 130 mW. As imagens do campo claro foram coletadas no canal 1 após iluminação com luz branca, o FITCPNA, BD-FL e YO-PRO foram coletados no canal 2 (505-560 nm), o IP no canal 5 (640-745 nm), M540 coletadas no canal 3 (560-595nm) e JC-1 nos canais 2 e 4 (595- 640 nm).

Para todas as análises de citometria de fluxo, alíquotas de sêmen (50µL) de cada grupo experimental foram adicionadas em microtubos (1,5mL), no qual, foi depositado lentamente 1,0 mL de PBS e homogeneizadas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (100 g/5 min), após, o sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspense em 40µL de PBS.

2.4.2.1. Avaliação da integridade de membranas plasmática, acrossomal e localização da $Na^+,K^+-ATPase$.

Para avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal e localização da $Na^+,K^+-ATPase$, em cada amostra foi adicionado 2 µL da solução de trabalho de BD-FL e incubado (37 °C/15 min em banho maria exp. 1 e banho seco exp. 2). Em seguida, 1 mL de PBS foi adicionado em cada amostra e centrifugadas (100 g/5 min). O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspense em 40 µL de PBS, sendo então adicionado 1,0 µL da solução de trabalho de FITC-PNA e 2,5 µL da solução de trabalho de IP. Incubou-se por 5 min à temperatura ambiente e procedeu-se a leitura.

Uma vez que células que apresentavam membrana acrossomal reagida (PNA+) raramente apresentavam marcação com BD-FL Ouabaína, para fim de análise, foram consideradas as seguintes subpopulações: 1) PNA-/IP-/BD FL+, células com membrana

plasmática e acrossomal íntegras marcadas com Bodipy® FL Ouabaína; 2) PNA-/IP+/BD FL+, células com membrana plasmática lesionada, acrossomal íntegra e marcadas com Bodipy® FL Ouabaína; 3) PNA-/IP+/BD FL-, células com membrana plasmática lesionada, membrana acrossomal íntegra e que não marcaram com Bodipy® FL Ouabaína; 4) PNA+/IP/BD FL-, células com membrana acrossomal reagida, plasmática íntegra que não apresentaram marcação com Bodipy® FL Ouabaína; 5) PNA+/IP+/BD FL-, células com membrana plasmática lesionada e acrossomal reagida sem marcação com Bodipy® FL Ouabaína.

2.4.2.2 Avaliação da estabilidade da membrana plasmática

A análise da estabilidade de membrana plasmática dos espermatozoides foi realizada a partir da associação dos fluorocromos M540 e Yo-Pro-1, de modo que, as amostras de sêmen foram incubadas com 5,0 µL YO-PRO por 15 minutos à 38,5 °C em banho seco, seguido da adição de 5,0 µL de M540 e incubadas por 5 min à temperatura ambiente e logo após realizou-se a leitura das amostras.

Foram consideradas as seguintes subpopulações: 1) MERO-/YO-, células viáveis com membrana plasmática estável e 2) MERO+/YO-, células viáveis com membrana desestabilizada.

2.4.2.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Para análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM) foram adicionados 5,0 µL de JC-1 as amostras de sêmen, onde foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente e procedeu-se à leitura. Considerou-se células com baixo potencial de membrana mitocondrial as que floresceram em verde a região de peça intermediária e alto potencial de membrana as que floresceram em laranja.

Ressaltando que, a avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada apenas nas amostras pertencentes ao experimento 2, sendo as demais análises realizadas em ambos os experimentos.

2.5 Experimento 1: influência da criopreservação sobre a Na^+ , K^+ -ATPase

2.5.1 Congelação e descongelação do sêmen

A alíquota de sêmen destinada à criopreservação foi diluída em meio Tris-gema para congelação (concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL). Após a diluição, as amostras foram envasada em palhetas de 0,25 mL previamente identificadas e congeladas em sistema automatizado (TK 3000® - TK Tecnologia em Congelação Ltda., Brasil). O processo de congelação iniciou em temperatura ambiente 25°C , utilizando a curva de refrigeração ($-0,25^\circ\text{C}/\text{min}$; 25°C à 5°C), em seguida, as palhetas foram submetidas a um período de estabilização durante 120 minutos à 5°C e, após este período, iniciou-se a curva de congelação ($-20^\circ\text{C}/\text{min}$; até -120°C), seguindo a imersão e armazenamento das palhetas em nitrogênio líquido (-196°C), até o momento das análises.

Para as análises pós-descongelação, quatro palhetas de cada repetição foram descongeladas em banho-maria à 37°C , durante 30 segundos, agrupadas e destinadas às avaliações de cinemática espermática (CASA), integridade de membranas plasmática e acrossomal, localização da Na^+ , K^+ -ATPase e estabilidade de membrana plasmática.

2.6 Experimento 2 - Influência da incubação em meio de capacitação sobre a Na^+ , K^+ -ATPase e do bloqueio da Na^+ , K^+ -ATPase om ouabaína sobre as características espermáticas

2.6.1 Capacitação espermática in vitro

Para capacitação espermática *in vitro* foi utilizada a metodologia descrita por Leahy et al., (2016), onde o sêmen *in natura* foi diluído em meio TALPm numa proporção 1:10

(PARRISH et al. 1988) e centrifugado (600 g/10 min). O sobrenadante foi desprezado e formouse um *pool* com o pellet espermático, o qual foi ressuspenso na razão 1:1 no mesmo meio. Em seguida, o *pool* foi aliqotado em dois grupos: um destinado a capacitação *in vitro* através da adição do soro de ovelha (SOE) em estro ao meio TALPm na concentração de 2,5%, e o outro para o bloqueio da Na⁺,K⁺-ATPase em meio TALPm acrescido a ouabaína (10⁻⁴ M), ambos distribuídos em dois tratamentos, grupo tratado (TALPm + 2,5% SOE; TALPm + ouabaína) e grupo controle (TALPm), ambos diuídos numa concentração final de 50 x10⁶ espermatozoides/mL.

As amostras foram analisadas quanto aos padrões cinemáticos dos espermatozoides através do CASA tanto para a capacitação quanto para o bloqueio da Na⁺,K⁺-ATPase, no entanto, as análises da integridade de membranas plasmática e acrossomal, localização da Na⁺,K⁺-ATPase, avaliação da estabilidade de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial, foram realizadas apenas para as amostras em meio de capacitação, avaliadas logo após a diluição final nos meios supracitados e após três horas de incubação em banho seco (38,5 °C).

2.7 Análises estatísticas

Para ambos os experimentos, os resultados estão expressos na forma de média ± erro padrão da média. Inicialmente os dados foram avaliados quanto à normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados foram submetidos à análise pelo teste Mann-Whitney sem transformação arco seno dos valores expressos em percentuais, uma vez que, os mesmos apresentaram distribuição normal. Para todas as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível de significância P<0,05.

3 Resultados

3.1 Experimento 1- influência da criopreservação sobre a Na^+ , K^+ -ATPase

3.1.1 Localização da Na^+ , K^+ -ATPase em sêmen ovino *in natura* e pós descongelção.

Independente da amostra do sêmen (*in natura* e pós descongelção), não foi observada diferença quanto a localização da Na^+ , K^+ -ATPase (Figura 01), em ambos pode-se identificar um padrão de distribuição uniforme localizado na peça intermediária dos espermatozoides.

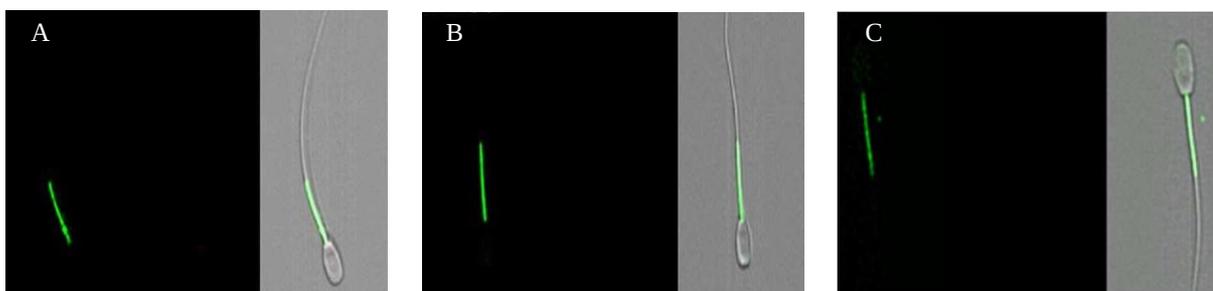


Figura 01- Localização da Na^+ , K^+ -ATPase em espermatozoide ovino *in natura* (A), pós descongelção (B) e capacitados *in vitro* (C), através da citometria de fluxo utilizando o fluorocromo Bodipy® FL Ouabaína.

3.1.2 Influência da criopreservação sobre a cinemática de espermatozoides ovinos

Na análise dos padrões cinemáticos do sêmen *in natura* e pós descongelção observouse uma redução significativa nas variáveis de motilidade total (MT; $P < 0,01$), motilidade progressiva (MP; $P < 0,01$), velocidade média da trajetória (VAP; $P < 0,05$) e aumento na frequência de batimento do flagelo (BCF; $P < 0,05$) – Tabela 01.

Tabela 01- Análise da cinemática espermática do sêmen de ovinos *in natura* diluído em meio Tris e imediatamente pós descongelamento, criopreservados em meio Tris-gema de ovo utilizando sistema automatizado.

Parâmetro	Tratamento	
	<i>In natura</i>	Descongelado
MT (%)**	81,62 ± 1,66 ^a	49,19 ± 2,25 ^b
MP (%)**	45,54 ± 3,76 ^a	25,18 ± 2,18 ^b
LIN (%)	79,64 ± 3,46	78,41 ± 1,99
STR (%)	88,60 ± 1,42	91,20 ± 1,88
WOB (%)	74,85 ± 4,64	71,34 ± 0,88
VCL (µm/s)	105,01 ± 7,73	92,88 ± 4,43
VSL (µm/s)	60,64 ± 3,50	51,65 ± 2,08
VAP (µm/s)*	76,36 ± 3,32 ^a	66,10 ± 2,85 ^b
ALH (µm)	2,96 ± 0,36	2,78 ± 0,09
BCF (Hz)*	10,90 ± 0,85 ^a	13,14 ± 0,28 ^b

Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa - ** P < 0,01, * P < 0,05.

Motilidade total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), índice de oscilação ou wobble (WOB), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade em Linha Reta (VSL) e Velocidade Média da Trajetória (VAP), Amplitude Lateral da Cabeça (ALH – ver se você usa essa denominação) e Frequência de Batimentos do Flagelo (BCF).

3.1.3 Influência da criopreservação sobre os parâmetros estruturais e funcionais de espermatozoides ovinos

O processo de criopreservação do sêmen ovino resultou em uma redução significativa de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras marcadas com Bodipy FL (PNA/IP-/BD FL+). Quanto a integridade da membrana plasmática, constatou-se um aumento de células com membrana acrossomal íntegra, plasmática lesionada, marcadas ou não com Bodipy FL (PNA-/IP+/BD FL+; PNA-/IP+/BD FL-, respectivamente), o mesmo ocorreu na

população de células com membrana acrossomal reagida, plasmática lesionadas não marcados com Bodipy FL (PNA+/IP+/BD FL-).

Com relação a estabilidade de membrana plasmática, o processo de congelação/descongelação do sêmen acarretou em um aumento significativo de células apresentando instabilidade da membrana plasmática (MERO+/YO-), conseqüentemente uma redução na estabilidade da membrana (MERO-/YO-).

Tabela 02- Parâmetros estruturais e funcionais de espermatozoides ovinos pós descongelação, avaliados em citometria de fluxo

Parâmetros	Tratamento	
	<i>In natura</i>	Pós descongelação
PNA- / IP- / BD FL+ (%)	72,72 ± 3,79 ^a	8,05 ± 1,07 ^b
PNA- / IP+ / BD FL+ (%)	9,97 ± 2,10 ^b	31,09 ± 5,02 ^a
PNA- / IP+ / BD FL- (%)	5,25 ± 1,13 ^b	38,28 ± 2,99 ^a
PNA+ / IP- / BD FL- (%)	0,21 ± 0,08	0,09 ± 0,02
PNA+ / IP+ / BD FL- (%)	10,77 ± 1,50 ^b	21,80 ± 4,06 ^a
MERO+/YO- (%)	6,80 ± 0,67 ^b	55,54 ± 7,40 ^a
MERO-/YO- (%)	91,88 ± 0,97 ^a	44,40 ± 7,39 ^b

Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa

Células com membrana plasmática e acrossomal íntegras marcadas com Bodipy FL (PNA-/IP-/BD FL+), células com membrana plasmática lesionada, membrana acrossomal íntegra e que marcaram com Bodipy FL (PNA- / IP+ / BD FL+), células com membrana plasmática lesionada, membrana acrossomal íntegra e que não marcaram com Bodipy FL (PNA- / IP+ / BD FL-), células com membrana acrossomal reagida, membrana plasmática íntegra e que não marcaram com Bodipy FL (PNA+/IP-/BD FL-), células com membrana plasmática lesionada e acrossomal reagida e que não marcaram com Bodipy FL (PNA+/IP+/BD FL-), células com membrana plasmática desestabilizada e viáveis (MERO+/YO-) e células com membrana plasmática estável e viáveis (MERO-/YO-).

3.2 Experimento 2 - Influência da incubação em meio de capacitação sobre a Na^+, K^+ -ATPase

3.2.1 Localização da Na^+, K^+ -ATPase em sêmen ovino incubados em meio de capacitação espermática

Independente da adição do sêmen ao meio de capacitação espermática (TALP + 2,5% SOE), a localização da Na^+, K^+ -ATPase manteve-se similar as amostras *in natura* e pós descongelação (Figura 01), permanecendo na região da peça intermediária no flagelo dos espermatozoides.

3.2.2 Influência do bloqueio da Na^+, K^+ -ATPase sob a cinemática de espermatozoides ovinos

A comprovação da capacidade de ligação da ouabaína com a Na^+, K^+ -ATPase é demonstrada na Figura 02, uma vez que as amostras de sêmen incubadas em meio enriquecido com ouabaína apresentou uma redução na marcação da Na^+, K^+ -ATPase (BD FL) quando comparado ao controle.

A influência da inibição da Na^+, K^+ -ATPase sobre a cinemática espermática, em amostras de espermatozoides ovinos mantidos em meio TALPm é apresentada na Tabela 02. Dentro de um mesmo tratamento, foi possível observar que as amostras incubadas em meio TALPm (grupo controle) reduziram significativamente os parâmetros de MT, VCL e ALH após o período de incubação, enquanto as amostras tratadas com ouabaína apresentaram redução significativa nos parâmetros de MP, VCL e VSL.

Quando avaliado o efeito da inibição da Na^+, K^+ -ATPase (entre tratamentos), observouse que desde o início da incubação (0 h) os valores de VAP foram inferiores no grupo tratado em relação ao controle ($P < 0,05$). Após o período de incubação (3 h) pode-se observar que, tanto os valores de VAP quanto aos do VSL se apresentaram inferiores ao do grupo Controle ($P < 0,05$).

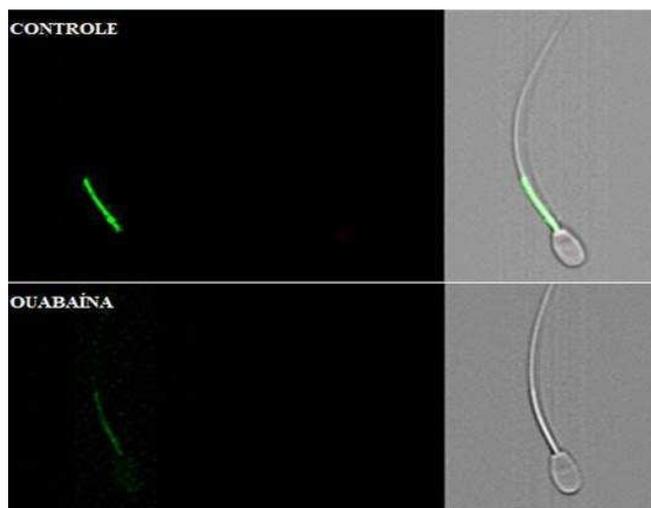


Figura 02- Capacidade de ligação do fluorocromo Bodipy® FL Ouabaína em espermatozoides ovinos incubados em meio TALPm após três horas de incubação (38,5 °C) em meio sem (controle) e com adição de ouabaína (10^{-4} M) (tratado).

Tabela 02- influência da inibição Na⁺,K⁺-ATPase com ouabaína (10⁻⁴ M) sobre a cinemática espermática, em amostras de espermatozoides ovinos mantidos em meio TALPm ao longo de três horas de incubação (38,5° C)

Parâmetros	Tratamento			
	Controle 0h	Controle 3h	Ouabaína 0h	Ouabaína 3h
MT (%)	60,38 ± 7,06 ^a	29,1 ± 8,34 ^b	59,20 ± 5,47 ^a	37,45 ± 10,49 ^{ab}
MP (%)	41,30 ± 6,07 ^a	20,00 ± 5,98 ^{ab}	38,20 ± 4,95 ^a	18,20 ± 4,56 ^b
LIN (%)	78,35 ± 2,78	81,55 ± 2,70	69,38 ± 4,50	76,52 ± 4,24
SRT (%)	88,60 ± 1,42	91,20 ± 1,88	81,38 ± 2,76	84,05 ± 3,53
WOB (%)	88,42 ± 2,40	89,38 ± 1,53	85,08 ± 3,37	90,82 ± 1,34
VCL (µm/s)	131,00 ± 9,05 ^a	105,88 ± 6,31 ^{bc}	122,65 ± 3,31 ^{ab}	99,70 ± 4,14 ^c
VSL (µm/s)	103,45 ± 11,14 ^a	86,08 ± 4,46 ^a	85,45 ± 7,66 ^a	75,85 ± 2,74 ^b
VAP (µm/s)	116,45 ± 11,12 ^a	94,60 ± 5,81 ^a	104,68 ± 6,86 ^b	90,45 ± 3,19 ^b
ALH (µm)	2,60 ± 0,21 ^a	1,80 ± 0,25 ^b	2,80 ± 0,38 ^a	2,08 ± 0,20 ^{ab}
BCF (Hz)	9,05 ± 0,43	7,72 ± 1,19	9,62 ± 0,61	7,82 ± 0,40

Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa (P < 0,05).

Motilidade total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), índice de oscilação ou wobble (WOB), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade em Linha Reta (VSL) e Velocidade Média da Trajetória (VAP), deslocamento Lateral da Cabeça (ALH) e Frequencia de Batimentos do Flagelo (BCF).

3.2.3 Influência da adição do soro de ovelha em meio TALPm sob a cinemática de espermatozoides ovinos

A influência da adição do soro de ovelha em estro (SOE; 2,5%) ao meio TALPm sobre a cinemática de espermatozoides ovinos está disposta na tabela 03. Na avaliação dentro de um mesmo tratamento ao longo da incubação, observa-se que as amostras incubadas em meio TALPm (grupo controle) reduziram significativamente os parâmetros de MT e MP, ao mesmo tempo que, as amostras tratadas com SOE apresentaram uma redução significativa nos parâmetros de MT, VCL e ALH.

Entretanto, quando avaliado o efeito da adição do SOE entre tratamentos, independente da incubação (0h-3h), não foi observada diferença ($P>0,05$) sobre os parâmetros da cinemática espermática.

Tabela 03: Influência da adição do soro de ovelha em meio TALPm sob a cinemática de espermatozoides ovinos

Parâmetros	Tratamento			
	Controle TALP	Controle TALP	Controle TALP +	Controle TALP +
	0h	3h	SOE 0h	SOE 3h
MT (%)	54,20 ± 3,62 ^a	30,25 ± 7,87 ^b	60,38 ± 7,06 ^a	29,10 ± 8,34 ^b
MP (%)	40,33 ± 2,77 ^a	18,53 ± 5,76 ^b	41,30 ± 6,01 ^{ab}	20,00 ± 5,98 ^b
LIN (%)	82,95 ± 0,89	79,50 ± 3,30	78,35 ± 2,78	81,55 ± 2,70
SRT (%)	91,85 ± 0,54	91,18 ± 1,28	88,60 ± 1,42	91,20 ± 1,88
WOB (%)	90,30 ± 0,94	87,12 ± 3,05	88,42 ± 2,40	89,38 ± 1,53
VCL (µm/s)	136,30 ± 3,65 ^a	96,22 ± 23,66 ^{ab}	131,00 ± 9,05 ^a	105,88 ± 6,31 ^b
VSL (µm/s)	112,98 ± 2,27 ^a	75,68 ± 19,20 ^{ab}	103,45 ± 11,14 ^{ab}	86,08 ± 4,46 ^b
VAP (µm/s)	123,00 ± 2,78 ^a	83,53 ± 21,40 ^{ab}	116,45 ± 11,12 ^{ab}	94,60 ± 5,81 ^b
ALH (µm)	2,30 ± 0,15 ^{ab}	2,00 ± 0,48 ^{ab}	2,60 ± 0,21 ^a	1,80 ± 0,25 ^b
BCF (Hz)	9,48 ± 0,26	7,83 ± 1,56	9,05 ± 0,43	7,73 ± 1,19

Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Motilidade total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), índice de oscilação ou wobble (WOB), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade em Linha Reta (VSL) e Velocidade Média da Trajetória (VAP), deslocamento Lateral da Cabeça (ALH) e Frequência de Batimentos do Flagelo (BCF).

3.2.4 Avaliação dos parâmetros estruturais e funcionais de espermatozoides ovinos incubados em meio de capacitação

A incubação (38,5°C/3hs) do sêmen ovino em meio de capacitação (TALPm+2,5% SOE) aumentou significativamente a proporção de células com membrana plasmática lesionada

(IP+) ao longo da incubação, assim como no percentual de células com membrana plasmática intacta e acrossomal reagida, não marcadas com Bodipy® FL Ouabaína (PNA+/IP-/BD-).

Quanto a integridade de membrana acrossomal (PNA-), constatou-se um aumento ($P < 0,05$) ao longo da incubação de células com membrana acrossomal íntegra. Os parâmetros da estabilidade de membrana plasmática (MERO+/YO- e MERO-/YO) e potencial de membrana mitocondrial (ALTO PMM e BAIXO PMM) foram similares ($P > 0,05$) ao longo do período de incubação.

Tabela 03- Parâmetros estruturais e funcionais de espermatozoides ovinos incubados durante três horas a 38,5°C em meio de capacitação TALPm+SOE, avaliados em citometria de fluxo

Parâmetros	Período	
	0h	3h
PNA-/IP-/BD FL- (%)	0,24 ± 0,07	0,41 ± 0,24
PNA-/IP-/BD FL+ (%)	2,10 ± 1,16	0,48 ± 0,1
IP+ (%)	70,72 ± 1,96 ^a	85,34 ± 2,71 ^b
PNA+/IP-/BD FL- (%)	26,77 ± 2,33 ^a	13,58 ± 2,70 ^b
ALTO PMM (%)	39,71 ± 11,08	22,14 ± 3,97
BAIXO PMM (%)	60,25 ± 11,13	77,91 ± 3,93
MERO-/YO- (%)	0,25 ± 0,12	0,12 ± 0,02
MERO+/YO- (%)	29,50 ± 22,47	12,31 ± 4,69

Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Células com membranas plasmática e acrossomal íntegras e que não marcaram com Bodipy FL (PNA-/IP-/BD FL), células com membrana plasmática e acrossomal íntegras marcadas com Bodipy FL (PNA-/IP-/BD FL+), células com membrana plasmática lesionada, membrana acrossomal íntegra e que não marcaram com Bodipy FL (IP+), células com membrana acrossomal reagida, membrana plasmática íntegra e que não marcaram com Bodipy FL (PNA+/IP-/BD FL-), células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial (ALTO PMM e BAIXO PMM), células com membrana plasmática desestabilizada e viáveis (MERO+/YO-) e células com membrana plasmática estável e viáveis (MERO-/YO-).

4 Discussão

A identificação da Na^+, K^+ -ATPase na peça intermediária em espermatozoides de ovinos, independente do *status* fisiológico (*in natura*, pós descongelção e capacitados *in vitro*) se assemelha com o padrão de localização encontrado por Woo et al. (2000), uma vez que, identificaram a Na^+, K^+ -ATPase em espermatozoides de ratos, especificamente a subunidade $\alpha 4$ na peça intermediária do flagelo, ressaltando a influência desta proteína sobre o parâmetro de motilidade espermática. De modo semelhante, Hlivko et al. (2006), realizaram um estudo visando localizar a subunidade $\alpha 4$ da bomba de sódio em espermatozoides de humanos, onde identificaram esta subunidade no flagelo, porém na peça principal.

Apesar da técnica de citometria de fluxo utilizando o fluorocromo Bodipy® FL Ouabaína nos permitir localizar a Na^+, K^+ -ATPase como um todo, não nos possibilitou identificar de modo diferenciado as subunidades, uma vez que, a concentração utilizada foi capaz de se ligar tanto a isoformas contendo a subunidade $\alpha 1$ quanto $\alpha 4$ (SANCHEZ et al., 2006).

Embora em nosso estudo o padrão de localização da Na^+, K^+ -ATPase tenha se assemelhado ao de ratos, o bloqueio desta proteína não influenciou nos padrões cinemáticos dos espermatozoides quando comparado ao controle, diferindo do estudo realizado em ratos, em que seu bloqueio resultou na redução rápida e significativa da motilidade (WOO et al., 2000). De modo similar, na espécie ovina, Peris et al. (2000) demonstraram que a adição da ouabaína em meio isosmótico ocasionou uma redução discreta, porém significativa, no parâmetro de motilidade.

A não influência do bloqueio sobre os parâmetros de motilidade, pode estar associado às vias metabólicas utilizadas pelos espermatozoides de ovinos. Apesar das mitocôndrias serem consideradas a principal fonte de ATP para a homeostase e motilidade espermática (TRAVIS et al., 1998), Losano et al. (2017) em estudo avaliando a influência das vias mitocondrial e glicolítica sobre a funcionalidade de espermatozoides ovinos, demonstraram que a glicolítica é

a de maior importância sobre a manutenção da motilidade espermática, e não necessariamente a cadeia transportadora de elétrons, que comumente sofrem influência do bloqueio dos canais iônicos celulares, ainda enfatizando que a via mitocondrial exerce maior influência sobre os padrões de velocidade nos espermatozoides.

As características descritas acima sobre as vias metabólicas explica o fato do bloqueio da Na^+, K^+ -ATPase tenha influenciado apenas nos parâmetros de velocidade VAP e VSL (redução). Entretanto, um outro fator que pode vir a ocasionar esta redução é a alteração do pH de modo que a atividade da bomba de sódio também atua em outros sistemas, por exemplo, no controle do pH, devido a sua funcionalidade agir junto ao trocador N^+/H^+ (JIMENEZ et al., 2010).

Apesar das vantagens, o processo de criopreservação pode acarretar diversas alterações às membranas espermáticas, incluindo a membrana plasmática, acrossomal externa e as mitocondriais (WATSON, 1995; ZAFFALON, 2009). Assim, a redução dos percentuais de motilidade espermática total e progressiva observada no presente experimento após a criopreservação, assemelha-se com resultados apresentados em diferentes espécies. Embora esta redução possa ser explicada devida às alterações ocorridas no transporte ativo e permeabilidade da membrana plasmática no flagelo, estudos vêm demonstrando que possivelmente mudanças quanto à disponibilidade de energia e danos as estruturas axonemais também possam contribuir (WATSON, 1995).

O aumento no percentual de células apresentando lesão de membrana plasmática e acrossomal observadas pós descongelamento em nossa pesquisa, pode estar associado a diversos fatores. Apesar da natureza destes danos ocasionados as membranas não está totalmente elucidada, estudos vêm demonstrando a relação da ocorrência dessas alterações com as mudanças ocasionadas às membranas durante o processo de criopreservação, por exemplo, às alterações físicas e osmóticas inerentes a este processamento (OLLERO et al., 1998).

Entretanto, outros fatores podem estar associados a ocorrência destas lesões às membranas, principalmente a plasmática, como a reorganização dos lipídios (PONS-REJRAJI et al., 2009), que resulta em modificações nas interações lipídio-lipídio e lipídioproteína presente na membrana (PARK e GRAHAM, 1992), formação de cristais de gelo e exposição das células a alta e baixa concentração de solutos (HOLT, 2000).

Junto às alterações de membranas supracitadas, observou-se também um aumento significativo no percentual de células apresentando membrana plasmática desestabilizada, que, de acordo com Steponkus e Lynch (1989), relaciona-se com as alterações osmóticas ocorridas nas células durante a congelação/descongelação. Ressaltando que, esta desestabilização é prejudicial à capacidade fertilizante das células, devido ocasionarem uma reação acrossomal precoce (CLARKE e JOHNSON 1987; MARSHBURN et al. 1992) reduzindo o tempo de vida dos espermatozoides (MARSHBURN et al. 1992).

Associado ao aumento significativo de células com membranas plasmática lesionada e acrossomal reagida, pode-se observar a redução de células marcadas com fluorocromo Bodipy® FL Ouabaína ao longo da congelação, fenômeno este que pode estar relacionado a algumas mudanças celulares, que, de acordo com PONS-REJRAJ et al. (2009) a perda de proteínas da membrana plasmática é uma das várias alterações ocasionadas durante o processo de criopreservação.

Visando adaptar-se às mudanças de temperaturas ocorridas durante o processo de congelação/descongelação, as células tendem a apresentar diferentes modificações na membrana plasmática, dentre as alterações podemos citar a translocação dos fosfolipídios entre os folhetos membranares, resultante da fosforilação da tirosina e do efluxo de colesterol ocorridos em espermatozoides criopreservados (SILVA e GADELLA, 2006).

O efluxo do colesterol ocorrido durante a criopreservação (SILVA e GADELLA, 2006) afeta diretamente a apresentação da bomba de sódio na membrana plasmática, uma vez que, o

colesterol é descrito como o sítio de ligação da subunidade β da Na^+ , K^+ -ATPase à membrana celular (SHINODA et al., 2009). Estas modificações podem acometer as interações físicas e químicas ocorridas entre a Na^+ , K^+ -ATPase e os lipídios, de modo a influenciar tanto na configuração como na atividade da proteína (CÂMARA et al., 2017).

O soro de ovelha em estro (SOE; 2-20%) é capaz em manter a viabilidade de espermatozoides ovinos (THOMPSON e CUMMINS, 1985), além de induzir capacitação espermática (PUGH et al., 1991; LEAHY et al., 2016), sendo de suma importância em processos de fertilização *in vitro* (FIV). Apesar da associação do SOE (2,5%) com o meio TALPm para indução da capacitação espermática no presente estudo, nossos resultados apresentaram-se de forma contraditória ao esperado, uma vez que a adição do SOE ao meio não influenciou significativamente em nenhum parâmetro cinemático dos espermatozoides, indicando a ineficiência do protocolo adotado.

A hiperativação celular é um dos indicativos de ocorrência da capacitação espermática (JANUSKAUSKAS et al., 1999), que caracteriza-se pelo aumento do VCL e ALH, junto a redução da linearidade e aumento da amplitude das ondulações flagelares (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002; MARQUES; SUAREZ; 2007). A ineficácia do SOE à capacitação espermática aqui observada, pode estar associada a diferentes fatores limitantes, como o processo de purificação das amostras para obtenção do soro e a variabilidade da composição entre as amostras (GARCÍA-ALVAREZ et al., 2015).

Além disso, outra razão em que pode ter implicado a ineficiência do SOE foi o fato de que, o meio utilizado para capacitação *in vitro* (TALPm + SOE) não foi acrescido de nenhum outro componente capacitante, uma vez que, a maioria dos estudos em que obtiveram eficiência do SOE à capacitação espermática, tinham associado a outros componentes como, a heparina, utilizada em diferentes concentrações tanto em sêmen fresco (HUNEAU et al., 1994; WANG et al., 1998; DATTENA et al., 2000), quanto pós descongelados (O'BRIEN et al., 1997; ZHU

et al., 2000; COGNIE et al., 2003) e a hipotaurina, que quando adicionada ao meio atuou sobre a remoção de radicais de oxigênio (WAKAYAMA et al., 1996), e junto a heparina resultou em uma elevação da motilidade e viabilidade espermática (LUKOSEVICIUTE et al., 2005; COGNIE et al., 2003; SOUZA et al., 2013).

Outro elemento a ser considerado é ao alto percentual de células marcadas com IP, indicativo de lesão de membrana plasmática, desde o início do processo de incubação, que, de acordo com Gadella e Harrison (2000) espermatozoides com alterações de membrana, podem vir a responder de forma diferenciada aos estímulos de capacitação.

Diante do exposto, pode-se concluir que, independente do *status* fisiológico da amostra do sêmen ovino, a Na⁺,K⁺-ATPase localiza-se no flagelo, especificamente na peça intermediária, e que, apesar da atividade desta proteína ter influenciado significativamente apenas em parâmetros de velocidade (VAP e VSL), junto a relevância da sua funcionalidade sobre a homeostase celular, é de suma importância o desenvolvimento de novas pesquisas que permitam elucidar sua real influência sobre os demais parâmetros não avaliados neste estudo, assim como, sua correlação com os canais iônicos presentes na membrana plasmática de espermatozoides na espécie ovina.

Referências

- AMANN, R. P.; PICKET, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173. 1987.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea And Febiger, 1993. p. 715-745.
- AMELAR, R. D.; DUBIN, L.; SCHOENFELD, C. Y. Sperm motility. **Fertil. Steril.**, v. 34, p. 197-215, 1980.
- AMORIM, E. A. M. **Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen**. 2008. 194 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

- APELL, H. J. How do P-Type ATPases transport ions?. **Bioelectrochemistry**, v. 63, p. 149 – 156, 2004.
- ARRUDA, R. P. et al. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade Bull sperm morphology: interpretation and impact on fertility. **Rev.Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 47-60, 2015.
- AXELSEN, K. B.; PALMGREN, M. G. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. **J. Mol. Evol.** v. 46, p. 84–101, 1998.
- AYUYAN, A. G.; COHEN, F. S. Raft Composition at Physiological Temperature and pH in the Absence of Detergents. **Biophysical Journal**, v. 94, p. 2654–2666, 2008.
- BACCETTI, B.; AFZELIUS, B. A. The Biology of the Sperm Cell. **Monographs in Developmental Biology**, v.10, New York: S. Karger, 1976.
- BLANCO, G.; MERCER, R.W. Isozymes of the Na⁺,K⁺-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **American Journal of Physiology**, v.275, p. 633–650, 1998.
- BLANCO, G. et al. Functional characterization of a testes-specific alpha-subunit isoform of the sodium/potassium adenosinetriphosphatase. **Biochemistry**, v. 38, p.13661–13669, 1999.
- BLANCO, G. et al. The alpha4 isoform of the Na,K-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. **J Histochem Cytochem**, v. 48, p. 1023–1032, 2000.
- BLANCO, G. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. **Semin. Nephrol.**, v. 25, p. 292–303, 2005.
- BORGES, J.C. et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Rev.Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.
- BREWER L.; CORZETT, M.; BALHOM, R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 38895–38900, 2002.
- BUBLITZ, M. et al. P-type ATPases at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, p. 25152519, 2011.
- BUFFONE, M. G. et al. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 79, p. 4–18, 2012.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2ª Ed., Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.
- CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v. 32, n.2, p. 93-99, 2008.

- CÂMARA, D. R.; KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Role of the Na⁺/K⁺-ATPase ion pump in male reproduction And embryo development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 1457-1467, 2017.
- CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2005.
- CELEGHINI, E.C.C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reprod. Domest. Anim.**, v.42, p.479-488, 2007.
- CLARKE, R. N.; JOHNSON, L. A. Effect of liquid storage and cryopresevation of boar spermatozoa on acrosomal integrity and the penetration of zona-free hamster ova *in vitro*. **Gamete Res.** v.16, p.193-204, 1987.
- COGNIE, Y. et al. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v.59, p.171-188, 2003.
- COOPER, G. M. A célula: uma abordagem molecular. In: ,DE ROBERTIS, E. D. P.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- DADOUNE, J. P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. **Microsc. Res. Tech**, v. 61, p. 56- 75.2003.
- DATTENA, M. et al. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 53, p.1511–1519, 2000.
- DARSZON, A. et al. Ion channels in sperm physiology. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 481 – 510, 1999.
- DARSZON, A. et al. Ion channels in sperm motility and capacitation. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 65, p. 229-244, 2007.
- DE LAMIRANDE, E.; LECLERC, P. GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoafor the acrossome reaction and fertilization. **Mol. Hum. Reprod.** v. 3, p. 175 – 194, 1997.
- 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.
- FOUQUET, J. P.; KANN, M. L. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. **Biol. Cell.** v. 81, p. 89-93, 1,994.

- GADELLA, B.M.; HARRISON, L.A. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. **Development**, v. 127, p. 2407-2420, 2000.
- GADELLA, B. M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 229 - 236, 2008.
- GALLEGO, O. et al. A systematic screen for protein-lipid interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Systems Biology**, v. 6 p.430, 2010.
- GARCÍA-ALVAREZ, O. et al. Effect of different media additives on capacitation of frozen-thawed ram spermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum. **Theriogenology**, v.84, p.948-955, 2015.
- GARNER, D. L. et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **BIOL. Reprod.** v. 57, p. 1401-1406, 1997.
- GHEORGHIADÉ, M.; PITT, B. Digitalis Investigation Group (DIAG) trial: a stimulus for further research. **Am. Heart J.** v. 134, p. 3–12, 1997.
- 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.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª Ed. São Paulo: Manole, 2004. HLIVKO, J.T., et al., The human Na,K-ATPase alpha 4 isoform is a ouabain-sensitive alpha isoform that is expressed in sperm. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 73, p. 101-15, 2006. HOLT, W. V. Basic aspects on frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**.V.62, p.3-22, 2000.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.
- HUNEAU, D.; CROZET, N.; AHMED-ALI, M. Estrous sheep serum as a potent agent for ovine IVF: effect on cholesterol efflux from spermatozoa and the acrosome reaction. **Theriogenology**, v.42, p.1017–1028, 1994.
- INABA, K. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. **Zool. Sci.**, v. 20, p. 1043–1056, 2003.
- JAMES, P. F. et al. Identification of a specific role for the Na⁺,K⁺-ATPase 2 isoform as a regulator of calcium in the heart. **Molecular Cell**, v. 3, p.555–563, 1999.
- JANUSKAUSKAS, A. et al. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**. v.52, p.641-658, 1999.

- JIMENEZ, T. et al. Activity of the Na, K-ATPase $\alpha 4$ isoform is important for membrane potential, intracellular Ca^{2+} , and pH to maintain motility in rat spermatozoa. **Reproduction**, v. 139, p. 835-845, 2010.
- JIMENEZ, T.; SANCHEZ, G.; BLANCO, G. Activity of the Na,K-ATPase $\alpha 4$ Isoform Is Regulated during sperm capacitation to support sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 5, p. 1047 – 1057, 2012.
- JORGENSEN, P. L.; HAKANSSON, K. O.; KARLISH, S. J. Structure and mechanism of Na,K ATPase: functional sites and their interactions. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 65, p.817–849, 2003.
- KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na^+ , K^+ -ATPase. **Annu. Rev. Biochem.**,71,p. 511–535, 2002.
- KONRAD, L. et al. Cardiotonic steroids trigger non-classical testosterone signaling in Sertoli cells via the $\alpha 4$ isoform of the sodium pump. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1813, p.21182124, 2011.
- LEAHY, T. et al. Penicillamine prevents ram sperm agglutination in media that support capacitation. **Reproduction**. v. 151, p. 167 – 177, 2016.
- LENZI, A. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction**. v. 2, n. 3 p. 246–256, 1996.
- LINGREL, J. B.; KUNTZWEILER, T. Na^+ , K^+ -ATPase. **J. Biol. Chem**. v. 269, p. 659– 662, 1994.
- LIU, et al. Ouabain interaction with cardiac Na^+ / K^+ -ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na^+ and Ca^{2+} concentrations. **J Biol Chem** v. 275, p. 27838–27844, 2000.
- LOSANO, J. D. A. et al. Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. **Reprod. Dom. Anim**. v. 52, p. 289–297, 2017.
- LUKOSEVICIUTE. K.; ZILINSKAS. H.; JANUSKAUSKAS. A. The effect of oestradiol, progesterone and heparin on bovine spermatozoa function after thawing. **Reprod Domest Anim**. v.40, p.100–107, 2005.
- MANN, T.; LUTWAK – MANN, C. Male Reproductive Function and Semen, **Springer Berlin**, 1981.
- MARSHBURN, P. B. et al. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. **Fertil. Steril**. v. 58, p.179-186, 1992.

- MARK, R. J. et al. Amyloid beta-peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis and cell death. **J Neurosci**, v.15, n. 9, p. 6239–6249, 1995.
- MARQUES, B.; SUAREZ, S. S. Different signalling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. **Biol. Reprod.** v. 70, p. 1626–1633, 2004.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial**. 5ª Ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. 344 p
- MOBASHERI, A. et al. Na^{+} , K^{+} -ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. **Bioscience Reports**, v. 20, p. 51–59, 2000.
- MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Hum. Reprod.**, v. 3, p. 403–439, 1997.
- MOTA FILHO, A. C. **Efeito da Adição de Dimetilformamida ao Diluente ACP-106 C Sobre as Características do Sêmen Canino Congelado**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Fortaleza, 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.
- OLLERO, M. et al. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing–thawing process. **Theriogenology**, v.49, p.547–555, 1998.
- O'CONNEL, M.; MCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, p. 704-709, 2002.
- PALMGREN, M.; NISSEN, P. P-Type ATPases. **Annu. Rev. Biophys.** v. 40, p. 243 – 266, 2011.
- NEWTON, L. D. et al. Na^{+}/K^{+} ATPase regulates sperm capacitation through a mechanism involving kinases and redistribution of its testis-specific isoform. **Mol. Reprod. Dev.** v. 77, p. 136–148, 2010.
- O'BRIEN, J.K. et al. In vitro and in vivo development capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. **Theriogenology**, v.47, p.1433–1443, 1997.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **The riogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.
- PARRISH, J. J. et al. Capacitation of bovine spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171–1180, 1988.
- PASUPULETI, V. **Role of glycolysis and respiration in sperm metabolism and motility**.

2007. 60 f. DISSERTAÇÃO (Mestrado em ciências biológicas) - Kent State University, College of Arts and Sciences. 2007.
- PERIS, S. et al. Ion-mediated resistance to osmotic changes of ram spermatozoa: The role of Amiloride and ouabain. **Theriogenology**, v. 54, p.1453-1467, 2000.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, Amsterdam, v. 37, p. 597-612, 2006.
- PETRUNKINA, A. M. et al. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. **Theriogenology**, v. 63, p. 1390-1406, 2005.
- PINEDA, M. H.; KAINER, R.A.; FAULKNER, L.C. Dorsal median postcervical fold in the canine vagina. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, p. 1487-1491, 1989.
- PONS-REJRAJ, H.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, p.525-537, 2009.
- PUGH, P.A., et al. Developmental ability of in vitro matured sheep oocytes collected during the nonbreeding season and fertilized in vitro with frozen ram semen. **Theriogenology**, v.36, p.771-778, 1991.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63. p.215-225, 2006.
- QUILL, T. A.; WANG, D.; GARBERS, D. L. Insights into sperm cell motility signaling through sNHE and the CatSpers. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, p. 84-92, 2006.
- RAMALHO-SANTOS, J.; SCHATTEN, G.; MORENO, R. D. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. **Biol Reprod**, v. 67, p. 1043-1051, 2002.
- RAMALHO-SANTOS, J. et al. Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy. In: **Modern Research and Educational Topics in Microscopy**, Coimbra, v.1, p.394-402, 2007.
- SANCHEZ, G. et al. The Na,KATPase alpha4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. **Mol Hum Reprod**, v. 12, p. 565-576, 2006.
- SCHONER, W.; SCHEINER-BOBIS, G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. **American Journal of Physiology, Cell Physiology**, v. 293, n. 2, p. C509-C536, 2007.

- SHAMRAJ, O. I.; LINGREL, J. B. A putative fourth Na⁺,K⁺-ATPase alpha subunit gene is expressed in testis. **Proc Natl Acad Sci** v. 91 p. 12952–12956, 1994.
- SHINODA, T. et al. Crystal structure of the sodium–potassium pump at 2.4 resolution. **Nature**, p.446–450, 2009.
- SHUKLA, K. K.; MAHDI, A. A.; RAJENDER, S. Ion Channels in Sperm Physiology Review and Male Fertility and Infertility. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 5, 2012.
- SILVA, P. N. F.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SILVA, S. V. **Avliação de espermatozoides ovino criopreservados em Tris-gema acrescido de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos**. 2010. 114 f. Tese (Doutorado em Ciência Veteriária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.
- SINGER, J. S.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of the cell membranes. **Science**. v. 175. p. 720 – 731, 1972.
- SIQUEIRA, J. B. **Relação da fertilidade do sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática “ In vivo”**. 2004. 91 f. Tese (mestrado em medicina veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- SOUZA, J. M. et al. Influence of heparin or the presence of cumulus cells during fertilization on the in vitro production of goat embryos. **Anim Reprod Sci**. v.138, p.82–89, 2013.
- SKOU, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim. Biophys. Acta**, v.23, p. 394–401, 1957.
- SOUZA, T. T. S. **Produção in vitro de embriões ovinos na presença de cafeína e vitamina E**. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2015.
- STEPONKUS, P. L.; LYNCH, D. V. Freeze-thaw induced destabilisation of the plasma membrane and the effects of cold acclimation. **J. Bioenerg. Biomembr.** v.21,p. 21-41, 1989.
- SUHAIL, M. Na⁺,K⁺-ATPase: ubiquitous multifunctional transmembrane protein and its relevance to various pathophysiological conditions. **J Clin Med Res**, v. 2, p. 1-17, 2010.
- SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G. *The sperm cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Minneapolis: Cambridge, 2006. 372 p.
- TAPIA, J. A. et al. The Membrane of the Mammalian Spermatozoa: Much More Than an Inert Envelope. **Reprod Dom Anim**, v. 47, p. 65–75, 2012.
- TIAN, J.; XIE, Z. J. The Na-K-ATPase and calcium-signaling microdomains. **Physiology**, v. 23, 2008.

- THOMAS, R.; GRAY, P.; ANDREWS, J. Digitalis: its mode of action, receptor and structure-activity relationships. **Adv Drug Res**, v. 19, p. 311–562, 1990.
- THOMPSON, J.C.E.; CUMMINS, J.M. The effects of washing and protein supplementation on the acrosome reaction of ram spermatozoa *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.9, n.1, p.75-86, 1985.
- THUNDATHIL, J. C.; ANZAR, M.; BUHR, M. M. Na⁺/K⁺ ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation. **Biology Reproduction**. v. 75, p. 308-317, 2006.
- THUNDATHILL, J. C. et al. The Effects of Increased Testicular Temperature on Testis-Specific Isoform of Na⁺/K⁺-ATPase in Sperm and its Role in Spermatogenesis and Sperm Function. **Reprod. Dom. Anim.** v. 47, P. 170–177, 2012.
- TRAVIS, A. J. et al. Targeting of a Germ Cell-specific Type 1 Hexokinase Lacking a Porin-binding Domain to the Mitochondria as Well as to the Head and Fibrous Sheath of Murine Spermatozoa. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, p. 263–276, 1998.
- TREVISI, L. et al. Antiapoptotic effect of ouabain on human umbilical vein endothelial cells, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 321, n. 3, p. 716–721, 2004.
- UNDERHILL, D. A. et al. The Na⁺,K⁺-ATPase alpha4 gene (Atp1a4) encodes a ouabain-resistant alpha subunit and is tightly linked to the alpha2 gene (Atp1a2) on mouse chromosome 1. **Biochemistry**, v. 38, p.14746–14751, 1999.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-157, 2002.
- VISCONTI, P. E. et al. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. **Development**, v. 121, p. 1139–1150, 1995.
- WAGONER, K. et al. Different expression and activity of the alpha1 and alpha4 isoforms of the Na/KATPase during rat male germ cell ontogeny. **Reproduction**, v. 130, p.627-641, 2005.
- WAKAYAMA, T. et al. Effect of hypotaurine on *in vitro* fertilization and production of term offspring from *in vitro*-fertilized ova of the Japanese field vole, *Microtus montebelli*. **Biol Reprod.** v.54, p.625–630, 1996.
- WANG, S.; LIU, Y.; HOLYOAK, G.R. A protocol for *in vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes. **Small Rumin. Res.** 29, 83–88, 1998
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p. 871-891, 1995.

- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved sêmen. **Animal Reproduction Science**. v. 6, p. 481 – 492, 2000.
- WASSALL, S. R.; STILWELL, W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1788, p. 24-32, 2009.
- WASSARMAN, P. M. Sperm receptors and fertilization in mammals. **Mt Sinai J Med**, v. 69, n. 3, p. 148–155, 2002.
- WOO, A. L.; JAMES, P. F.; LINGREL, J. B Characterization of the fourth alpha isoform of the Na,K-ATPase. **J Membr Biol**, v. 169, p. 39–44, 1999.
- WOO, A. L.; JAMES, P. F.; LINGREL, J. B. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na⁺,K⁺-ATPase. **The Journal Biology Chemistry**, v. 275, n. 27, p.20693-20699, 2000.
- YANAGIMACHI, R.1994: Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York, pp. 189–317, 1994.
- ZAFFALON, F. G. **Alterações semelhantes a capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores a base de gema de ovo ou lecitina de soja**. 2009.95f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 2009.
- ZHU, S.E. et al. Vitrification of in vivo and in vitro produced ovine blastocysts. **Anim. Biotech**. p.193–203, 2000.
- ZHOU, J. et al. Thee Semen pH Affects Sperm Motility and Capacitation. **PLoS ONE**, v. 10, 2015.

ANEXO 1 – Licença do Comitê de Ética para Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

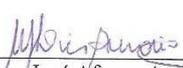


Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-B05

Licença condicional para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

A Comissão de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	71/ 2017
Número do processo	23082.005950/2017-10
Data de emissão da licença	07 de junho 2017.
Título do Projeto	Localização da Na/K-ATPase em espermatozoides de ovinos <i>In Natura</i> , capacitados <i>In Vitro</i> e Pós-descongelamento.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa.
Responsável pela execução do projeto	Maria Madalena Pessoa Guerra.
Colaboradores	Aline Saraiva de Oliveira; Diogo Ribeiro Câmara; André Mariano Batista; Robespierre Augusto Joaquim Araújo Silva; Lúcia Cristina Pereira Arruda; Millena Maria Monteiro.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Espécie: Ovino. Linhagem: Santa Inês. Idade: 02 a 03 anos; Peso aprox.: 40 a 60Kg. Quantidade: 04 Machos e 01 fêmea. Machos + fêmeas = 05. Total = 05.


Prof.ª Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA /UFRPE)

Prof.ª Dr.ª Marleyne Amorim
Presidente CEUA/UFRPE
SIAPE 384977