

**Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**

ANÍBAL BALLAROTTI NASCIMENTO

**EFEITO DA ÁGUA DE COCO E BTS
ASSOCIADOS À CAFEÍNA NA CAPACITAÇÃO
ESPERMÁTICA *IN VITRO* EM SUÍNOS**

**Fortaleza – Ceará
Outubro/2003**

**Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**

ANÍBAL BALLAROTTI NASCIMENTO

**EFEITO DA ÁGUA DE COCO E BTS
ASSOCIADOS À CAFEÍNA NA CAPACITAÇÃO
ESPERMÁTICA *IN VITRO* EM SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tonioli

**Fortaleza – Ceará
Outubro/2003**

N244e Nascimento, Aníbal Ballarotti.

Efeito da água de coco e BTS associados à cafeína na capacitação espermática *in vitro* em suínos / Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Fortaleza: UECE, 2003.

48 p: il.; 29,7 cm.

Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Fortaleza: UECE, 2003.

1. Suínos – Fecundação *in vitro*. I. Efeito da água de coco e BTS associados à cafeína na capacitação espermática *in vitro* em suínos.

CDD: 636.08926

Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Aníbal Ballarotti Nascimento

Titulo do Trabalho: Efeito da água de coco e BTS associados à cafeína na capacitação espermática *in vitro* em suínos

Autor: Aníbal Ballarotti Nascimento

Aprovada em __/__/__

Prof. Dr. Ricardo Toniolli
Orientador

Prof. Dr. José Antonio Visintin
Co-orientador/Examinador

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo
Co-orientador/Examinador

***Dificuldades reais podem ser
resolvidas; apenas as imaginárias são
insuperáveis.***

(Theodore N. Vail)

A meus pais Espedito e Nélia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar saúde e condições de concluir mais esta etapa na minha vida pessoal e profissional.

A meus amados pais Espedito e Nélia, por todo o suporte emocional e material, por serem meu referencial de amor e honestidade, e pelos valores cristãos que me ensinaram.

A meus irmãos Eliana, Alexandre e Celina, presentes de Deus na minha vida, que sempre me encorajaram diante das dificuldades.

À minha namorada Walquíria, pela compreensão e companheirismo, por não permitir que as distâncias nos afastassem, por sempre me apoiar com sua tranquilidade e serenidade para eu permanecer firme pelo caminho.

A meus cunhados Vanessa e Marcelo pela amizade e preocupação.

Ao Prof. Dr. José Antonio Visintin, que me deu a mão em um momento crucial do curso. Estar na USP foi uma experiência muito enriquecedora e os amigos que fiz por lá levarei comigo por todos os meus dias.

Ao meu orientador Dr. Ricardo Toniolli pela confiança e oportunidade, e ao Dr. José Ricardo de Figueiredo pelo convite para fazer o mestrado em Fortaleza.

A meus companheiros de república em Fortaleza, Kenio Oliveira, Faviano Moreira e Zé Luis Filho, de mestrado, Annira e Annice Cortez, Michelle Silva, Vandberg Bráz e Vanessa Machado, e de laboratório, Roberta Chaves e Fabrício Aires pela inestimável ajuda e convivência.

Aos grandes amigos que fiz na USP, Alessandra, Camila, Camilla, Claudia, Helô, Júlia, Lampréia, Luís Felipe, Marcella, Marcílio, Marquinho, Mariana, Mayra, Nani, Renata, Viviane e Wálber, por toda a amizade e ajuda durante o tempo que fiquei em São Paulo.

Mais uma vez ao Marcelão (Seneda), que desde a graduação me auxilia na caminhada e muito me estimulou a cursar o mestrado.

Aos meus primos Carol, Myriam e Rafael, com os quais morei em São Paulo, pela paciência.

A vó Helena e vô Annibal (*in memmorian*) de quem sinto muita saudade, por me incentivar desde criança a escolher a veterinária como profissão.

Ao meu amigo Éverson Moraes que sempre esteve próximo em todos os momentos.

Ao Ramiro, Szafir e Zulu (os varrões do meu experimento) por terem aprendido tão rápido! E ao Irailton que ajudou muito nas coletas do material.

E a todos, que de uma forma ou de outra puderam colaborar para a realização deste objetivo.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo comparar dois diluidores de sêmen suíno e sua interação com a cafeína como promotor de capacitação espermática *in vitro*. Foram coletados 18 ejaculados de três varrões e diluídos em solução à base de água de coco em pó (ACP) e em diluidor *Beltsville Thawing Solution* (BTS). Foram realizados dois experimentos com os diluidores associados à cafeína e dois apenas com os diluidores. Os tratamentos foram avaliados a fresco e refrigerado a 16 °C por 24 horas. Para a capacitação, os tratamentos foram processados e incubados em estufa de CO₂ com 95% de umidade por 3 horas em meio TALP. Para avaliar as taxas de capacitação espermática foram feitos esfregaços e as lâminas coradas com Coomansie Blue G. Verificou-se nos resultados que não houve diferença entre o sêmen diluído em ACP ou em BTS ($p > 0,05$). Os tratamentos com o sêmen refrigerado foram significativamente superiores em relação ao sêmen a fresco ($p < 0,05$). Com a refrigeração os resultados foram os seguintes, ACP com cafeína a taxa de capacitação foi de 43,7% e sem cafeína somente 18,2% ($p < 0,05$). Os resultados com BTS seguiram este padrão, com cafeína 48,1% e sem cafeína apenas 18,3% de capacitados. Assim, pôde-se concluir que o ACP associado à cafeína pode ser utilizado com eficiência em tratamentos de capacitação espermática *in vitro* em suínos, preferencialmente após refrigeração a 16 °C por 24 horas.

SUMMARY

The aim of this work was to compare two different extenders and the interaction with caffeine as promoter of *in vitro* spermatic capacitation. Eighteen ejaculates from three boars were extended with powder coconut water reconstituted (ACP) and in a commercial extender, Beltsville Thawing Solution (BTS). Treatments consisted in the two extenders associated or not with caffeine. The sperm capacitation was done in a CO₂ incubator with 95 % of humidity for three hours in a TALP medium supplemented with BSA. Two periods of dilution were tested, fresh and cooled at 16 °C and stored by 24 hours. The spermatic capacitation was evaluated by semen films stained with Coomansie Blue G. It was observed no differences between the sperm extended with ACP or with BTS ($p < 0.05$). Comparing the fresh and cooled semen, the second one was significantly best ($p < 0.05$). In the presence of caffeine and cooled, the proportion of capacitated semen was 43.7% and 48.1% for, respectively, ACP and BTS extenders ($p > 0.05$). In the absence of caffeine, the proportion of capacitated semen was 18.2% for ACP and 18.3% for BTS ($p > 0.05$). We concluded that ACP – caffeine – cooled treatment may be considered an efficient option for *in vitro* swine sperm capacitation.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA.....	3
2.2	CAFEÍNA.....	6
2.3	DILUIDORES.....	7
2.4	ÁGUA DE COCO.....	8
2.5	AVALIAÇÃO REAÇÃO ACROSSÔMICA.....	9
3.	JUSTIFICATIVA.....	11
4.	OBJETIVOS.....	12
4.1	OBJETIVO GERAL.....	12
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
5.1	COLETA E PREPARAÇÃO DO SÊMEN.....	13
5.2	CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA.....	14
5.3	AVALIAÇÃO REAÇÃO ACROSSÔMICA.....	15
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
5.5	ESQUEMA DO PROTOCOLO.....	18
6.	RESULTADOS.....	19
7.	DISCUSSÃO.....	21
8.	CONCLUSÕES.....	25
9.	PERSPECTIVAS.....	26
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
11.	ANEXOS.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP = Água de coco em pó

AMP = Adenosina Monofosfato

AMPc = Adenosina Monofosfato Cíclico

ATP = Adenosina Trifosfato

BSA = Albumina Sérica Bovina

BTS = Belstville Thawing Solution

CAF = Cafeína

DIC = Microscopia de Interferência Diferencial

FIV = Fecundação *in vitro*

FPP = Peptídeo Promotor de Fertilização

PIV = Produção *in vitro*

IAA = Ácido 3-Indol Acético

mM = Milimolar

mTBM = Meio Tamponado com Tris Modificado

PB = Proteína Bruta

1. INTRODUÇÃO

Durante a década passada, muitas pesquisas foram direcionadas no intuito de se obter maior controle da reprodução suína. Vários avanços na genética de suínos têm sido alcançados devido a fatores como a possibilidade de utilizar animais desta espécie como doadores de tecidos e órgãos específicos para xenotransplantes (DAY, 2000).

A produção de embriões em laboratório ou fecundação *in vitro* (FIV) é uma biotécnica que vem sendo amplamente estudada. Apesar de não apresentar o mesmo sucesso alcançado em bovinos e em humanos, esta técnica apresenta um grande potencial e aproxima-se cada vez mais de uma aplicabilidade comercial na espécie suína (CAMERON, 1998).

Os espermatozoides de mamíferos em geral, imediatamente após a ejaculação, não são capazes de fecundar os oócitos, sendo necessária sua passagem pelo trato genital feminino, para que ocorra a capacitação espermática (VISCONTI *et al.*, 1999).

Os primeiros relatos sobre a capacitação espermática datam de 1951 (CHANG, 1951). No entanto, há aspectos ainda não totalmente esclarecidos quanto às alterações físicas e bioquímicas do processo (FLESCH *et al.*, 1999).

Alterações de membrana como o aumento de sua fluidez, aumento do pH intracelular, alterações no fluxo iônico, além de alterações morfológicas associadas à reação acrossômica, conferem aos espermatozoides condições de aderir à zona pelúcida e iniciar o processo de fecundação. Para isto, faz-se necessário o uso de um agente capacitante. Um dos mais utilizados é a cafeína, comprovadamente eficaz para promover a capacitação espermática (WANG *et al.*, 1991).

A função básica do diluidor é prolongar a viabilidade dos espermatozoides, fornecendo-lhes nutrientes e fatores de resistência ao choque térmico. O diluidor e a temperatura ideais capazes de oferecer maior longevidade aos espermatozoides de suínos ainda não são totalmente conhecidos (VARNER *et. al.*, 1987).

Diversos diluidores têm sido utilizados no processamento do sêmen suíno e pouco se sabe sobre os resultados de sua interação com um agente capacitante. Os elementos necessários à capacitação e até mesmo a sobrevivência espermática do sêmen suíno ainda não são totalmente conhecidos. Por isso, é necessária a geração de novos conhecimentos em diferentes campos da ciência, incluindo a bioquímica e a metodologia do resfriamento do sêmen suíno (SHEID *et al.*, 1991; MARIANO *et al.* 1992).

A solução à base de água de coco é rica em nutrientes, pode ser adquirida a um baixo custo, tem sido utilizada com sucesso na conservação de sêmen de várias espécies e também na maturação de oócitos e cultivo de embriões bovinos. Porém, estudos utilizando a água de coco na capacitação espermática não foram verificados na literatura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

As etapas básicas pelas quais o espermatozóide precisa passar antes de penetrar o oócito são: capacitação, penetração do complexo cumulus, ligação com a zona pelúcida, reação acrossômica, ligação secundária com a zona pelúcida, penetração da zona pelúcida, entrada no espaço perivitelíneo e finalmente ligação e fusão com a membrana plasmática com subsequente ativação do oócito. O sistema de reconhecimento e fusão oócito-espermatozóide é mediado por um dinâmico processo de modificações protéicas e interações na membrana plasmática. (TOPFER-PETERSEN *et al.*, 2000).

Uma etapa essencial do processamento *in vitro* dos espermatozoides é alcançar a capacitação de maneira artificial tão bem como controlar o tempo da reação acrossômica, porque somente espermatozoides capacitados podem ser reconhecidos pelo oócito e responder aos sinais oocitários de maneira apropriada (TOPFER-PETERSEN *et al.*, 2000).

O conceito de capacitação espermática foi mencionado pela primeira vez no início da década de 1950 (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951). De acordo com estes autores, os espermatozoides precisam passar por uma série de modificações antes de adquirir a capacidade de penetrar os oócitos.

Sob condições fisiológicas estas modificações ocorrem ao longo do trato genital feminino e o papel do istmo do oviduto é especialmente importante no processo (HUNTER e NICHOL, 1988).

Baseado nessa idéia e nos resultados em outras espécies, o primeiro sucesso alcançado na penetração *in vitro* de um oócito suíno envolveu a submissão do sêmen a um procedimento relativamente complexo, incluindo várias lavagens por

centrifugação e pré-incubação dos espermatozóides em altas concentrações de cálcio a 37 °C (PAVLOK, 1981).

O objetivo dessas lavagens por centrifugação e pré-incubação foi desestabilizar a membrana plasmática dos espermatozóides e prepará-los para a reação acrossômica. Assim, CHENG (1985) modificou alguns detalhes da técnica criada por PAVLOK, descrita anteriormente, e produziu a primeira ninhada de leitões por meio de fecundação *in vitro* (FIV).

A capacitação espermática é um processo sem o qual não pode ocorrer a reação acrossômica, pré-requisito para a realização da fecundação. A reação acrossômica é um processo de excitose em que ocorre a fusão da membrana plasmática do espermatozóide com a membrana acrossomal externa, liberando enzimas acrossomais e permitindo que o espermatozóide atravesse a zona pelúcida e se fixe ao oócito (YANAGIMACHI, 1994).

O processo de capacitação espermática provoca alterações bioquímicas na membrana plasmática dos espermatozóides, fornecendo condições para a ocorrência da reação acrossomal. A capacitação promove a remoção gradual e alterações de glicoproteínas periféricas na cabeça dos espermatozóides, provoca a perda do colesterol pela membrana plasmática e alterações na distribuição e composição de certos fosfolípidos de membrana (YANAGIMACHI, 1994).

Todas as modificações que ocorrem na membrana plasmática dos espermatozóides podem ser observadas *in vitro* em diversos meios quimicamente definidos que contenham fontes energéticas como o piruvato, o lactato, a glicose e fontes protéicas como a albumina sérica bovina, o bicarbonato de sódio e o cálcio, sugerindo assim, que a capacitação espermática seja regulada pelo próprio espermatozóide (VISCANTI e KOPF, 1998).

A albumina sérica bovina (BSA) está fortemente ligada à remoção do colesterol da membrana plasmática, favorecendo a produção do Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc) que induz a fosforilação da tirosina. Esta remoção do colesterol faz com que a membrana plasmática torne-se mais fluida,

modulando o fluxo de íons cálcio (Ca^{+2}) e íons bicarbonato de sódio (NaHCO_3^-). Estes íons controlam a ativação da adenil ciclase, sugerindo que os cátions bivalentes têm importante papel na capacitação espermática. Portanto, a fosforilação da tirosina é modulada pelo AMPc que regula a via de fosforilação da tirosina pela proteína quinase A (VISCANTI e KOPF, 1998).

O principal evento que ocorre durante o processo de capacitação espermática é a retirada ou a alteração dos estabilizantes ou capa protetora da membrana plasmática dos espermatozóides, sensibilizando-os ao meio de fecundação e aos oócitos. A membrana plasmática fica exposta diretamente ao meio de capacitação, sendo a superfície dos espermatozóides revestida principalmente por fatores decapacitantes, todos originados no plasma seminal (YANAGIMACHI, 1994).

Segundo o mesmo autor, há influxo de cálcio para o interior da célula espermática durante a capacitação. Normalmente, estas quantidades estão baixas, pois há ação das adenosinas trifosfatases (ATPases) mediadas pela bomba de cálcio, sistema de carregamento sódio/cálcio, sistema de troca de íons cálcio e hidrogênio da membrana plasmática e pelo seqüestro de cálcio pelas mitocôndrias. Mesmo com o influxo de cálcio no momento da reação acrossômica, acredita-se que a quantidade de cálcio intracelular seja menor que no meio externo. A ativação do AMPc proteína quinase dependente desempenha importante papel na ativação e na manutenção da motilidade espermática, durante a capacitação.

O esteróide mais abundante no espermatozóide é o colesterol, porém existem outros como o desmoterol, que é um precursor do colesterol, o sulfato de desmoterol, os ésteres de colesterol, que são moléculas responsáveis pela regulação da função espermática. A relação existente entre as taxas de colesterol e de fosfolipídeos na membrana plasmática determina o estado de capacitação ou não do espermatozóide. No decorrer da capacitação, o colesterol move-se da membrana para os receptores, tornando-os solúveis e os fosfolipídeos movem-se para a membrana plasmática, possibilitando definir o estado do espermatozóide baseado nos níveis destes fosfolipídeos (CROSS, 1998).

A aglutinação de cabeça com cabeça pode ser um evento da capacitação espermática. Existem proteínas responsáveis pela não aglutinação, que são secretadas no ducto e corpo do epidídimo e aderem ao acrossomo. Estas proteínas podem ser identificadas no sêmen fresco, mas com redução na sua concentração durante o processo de incubação e capacitação *in vitro* (HARAYAMA *et al.*, 1999).

2.2 CAFEÍNA

A cafeína, considerada um inibidor da fosfodiesterase, permite o aumento da concentração do AMP cíclico durante a capacitação espermática, modulando a adenil ciclase e a reação acrossômica. Em estudos realizados por FUNAHASHI e NAGAI (2001), as sondas fluorescentes de clortetraciclina (CTC) mostraram que a cafeína induz a capacitação espermática e a reação acrossômica em sêmen *in natura* de suínos e, conseqüentemente aumentam a penetração de espermatozóides. Porém, a cafeína aumenta a polispermia. Conforme aumenta-se a concentração de cafeína aumenta também a penetração oocitária pelos espermatozóides (ABEYDEERA e DAY, 1997, FUNAHASHI e NAGAI, 2001), sendo a taxa de polispermia de 33,9; 85,7; 86,3 e 95,2% nas concentrações de 0; 1; 2,5; 5 mM de cafeína, respectivamente (ABEYDEERA e DAY, 1997).

Muitos meios de FIV em suínos são suplementados com cafeína para elevar a concentração de AMPc intracelular. Em estudos recentes, FUNAHASHI *et al.* (2000) observaram os efeitos da cafeína, do peptídeo promotor de fertilização (FPP) e adenosina nos parâmetros de fecundação de oócitos maturados *in vitro*. No meio em que se utilizou o FPP, as taxas de fecundação foram de 75%, com adenosina, 71% e, ao suplementar o meio com cafeína, os índices chegaram 98%. Apesar da alta incidência de polispermia, este é o agente capacitante mais utilizado na capacitação espermática em suínos.

Em se tratando de meio de fecundação que age no processo de capacitação espermática, sabe-se que o meio tamponado com Tris modificado (mTBM), sem bicarbonato e sem hepes em tampão Tris e suplementado com cafeína, em

condições de atmosfera úmida com 5% de CO₂ em ar, suporta tanto a capacitação espermática, quanto a reação cortical de oócitos em suínos. O meio mTBM suplementado com 0,1 ou 0,4% de BSA apresenta taxas de penetração (99 e 95%) e de polispermia (93 e 96%) semelhantes, porém mostra maior número de espermatozoides penetrados por oócito no meio com 0,4% de BSA (ABEYDEERA e DAY, 1997).

2.3 DILUIDORES

A função básica do diluidor é prolongar a viabilidade dos espermatozoides, fornecendo-lhes nutrientes ou fatores de resistência. O diluidor e a temperatura ideais capazes de oferecer maior longevidade aos espermatozoides ainda não são totalmente conhecidos, especialmente a baixas temperaturas (VARNER *et al.*, 1987).

Diversos diluidores têm sido utilizados para processar, resfriar e armazenar o sêmen do suíno. Entretanto, a maioria deles causa limitação à sobrevivência espermática, pois os elementos necessários à sobrevivência espermática do suíno ainda não são totalmente conhecidos. A elevação dos resultados de capacitação e fertilidade, com uso de sêmen suíno, depende da geração de novos conhecimentos em diferentes campos da ciência, como a bioquímica e a metodologia do resfriamento do sêmen suíno (SCHEID *et al.*, 1991; MARIANO *et al.*, 1992).

A resistência dos espermatozoides ao choque térmico difere entre as várias espécies, os do homem, cão, galo e coelho são os mais resistentes, enquanto entre os mais sensíveis estão os do suíno (BOUCHARD *et al.*, 1990). As diferenças parecem estar relacionadas à composição química e molecular das membranas plasmática e mitocondrial, especialmente os ácidos graxos e os fosfolípidios (POULOS *et al.*, 1973). Em consequência do choque térmico, lesões irreversíveis são observadas especialmente no acrossoma com desprendimento e perda de conteúdo (PURSEL *et al.*, 1972; WATSON e PLUMMER, 1985).

2.4 ÁGUA DE COCO

A solução à base de água de coco é um meio rico em nutrientes, de baixo custo, que tem sido utilizada com sucesso para a conservação de sêmen suíno (TONIOLLI *et al.*, 1998), humano (NUNES, 1998), caprino (NUNES & SALGUEIRO, 1999), ovino (GUERRA & NUNES, 1999) e canino (SILVA *et al.*, 2001). Já foi utilizado também na maturação de oócitos (BLUME *et al.*, 1997a) e cultivo de embriões bovinos (BLUME *et al.*, 1997b) e murídeos (BLUME & MARQUES Jr., 1994).

NUNES *et al.* (1994) isolaram da água de coco, uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o ácido 3-indol-acético (IAA), que tem ação benéfica sobre os espermatozoides. O IAA é um hormônio que atua no crescimento de vegetais (BARBIER-BRYGOO, 1995), ligando-se às proteínas solúveis da seiva, sendo transportado a receptores transmembranários, provocando respostas celulares como o aumento da plasticidade da parede celular, aumento da entrada de água na célula e alteração do metabolismo nos ácidos nucléicos e da respiração celular (GALSTON e PURVES, 1960; TONIOLLI *et al.*, 1996), o que promove o crescimento da célula (BARBIER-BRYGOO, 1995).

Foram realizados estudos utilizando o IAA na conservação de células animais. TONIOLLI *et al.* (1996) utilizaram o IAA para conservar sêmen suíno a 15°C, apresentando resultados satisfatórios. O IAA também foi utilizado para conservar folículos pré-antrais (FOPA) caprinos a 4°C por até 24 horas (FERREIRA *et al.*, 2001).

A água de coco é uma solução ácida e estéril composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, além dos indutores de divisão celular e eletrólitos diversos que lhe conferem densidade e pH comparáveis ao plasma sanguíneo. Esta composição atende às exigências nutritivas dos embriões até então conhecidas pela fisiologia embrionária.

Segundo LETHAM (1974), também são encontrados na água de coco princípios ativos com propriedades semelhantes às auxinas e citocininas, que regulam o crescimento e provocam a divisão celular nas plantas, fungos, algas e alguns protozoários (BLUME & MARQUES Jr., 1994).

As pesquisas com embriões *in vitro* têm concentrado sua atuação no exame dos componentes dos meios, no uso de co-culturas, na exploração do papel dos nutrientes e dos fatores peptídicos de crescimento e proliferação celular. A necessidade nutricional do embrião é maior do que se preconizava e com isto, busca-se enriquecer os meios existentes e encontrar meios alternativos para atender as exigências do embrião e melhorar os índices de sobrevivência e viabilidade embrionária (KANE *et al.*, 1992; MINAMI *et al.*, 1992).

2.5 AVALIAÇÃO DA REAÇÃO ACROSSÔMICA

O uso de substâncias capacitantes para induzir a reação acrossômica é de grande importância, podendo-se assim estimar a fertilidade, pois animais mais férteis apresentam maior número de espermatozoides que sofrem reação acrossômica (LIM *et al.*, 1997).

Um dos parâmetros mais utilizados para se verificar os danos causados pela preservação do sêmen é a análise da viabilidade espermática, sendo a reação acrossômica um importante parâmetro para a qualificação das células viáveis. Vários métodos têm sido empregados para distinguir espermatozoides viáveis de não viáveis, como a eosina-nigrosina e as sondas fluorescentes com coloração simples como o diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio ou Hoechst 33258 (PINTADO *et al.*, 2000).

O Coomansie Blue G é um corante utilizado para avaliação da reação acrossômica. Os espermatozoides que não sofreram reação apresentam acrossomos corados em azul intenso e os que sofreram reação apresentam acrossomos corados em azul tênue (LARSON e MILLER, 1999).

Um dos maiores problemas no estudo da reação acrossômica reside na impossibilidade de observá-la ao microscópio de contraste de fase sem coloração. Várias técnicas de coloração vêm sendo desenvolvidas. Por citometria de fluxo, foi possível identificar que a região acrossômica é rica em glicoconjugados, o que sugere que estas regiões sejam constituídas por glicosaminoglicanos (VÁSQUEZ *et al.*, 1993).

3. JUSTIFICATIVA

A produção *in vitro* de embriões suínos é uma biotécnica muito promissora que ainda precisa ser aperfeiçoada para oferecer números mais consistentes e aplicabilidade comercial, como já ocorre em bovinos ou mesmo em humanos.

A possibilidade de utilização de suínos como doadores de órgãos e tecidos específicos em xenotransplantes motiva estudos mais aprofundados de biotécnicas que viabilizem sua produção e modificação genética.

Assim, o estudo de todas as etapas que antecedem a fecundação *in vitro* propriamente dita é importante para o domínio da técnica.

Por isso, procurou-se avaliar neste trabalho um novo protocolo de capacitação espermática em suínos, em que se observaram as possíveis ações entre os diluidores à base de ACP e BTS, em presença ou ausência de cafeína, com processamento do sêmen a fresco ou refrigerado por 24 horas.

A água de coco já foi demonstrada como substância comprovadamente eficaz em testes realizados com outras técnicas como a maturação de oócitos (BLUME *et al.*, 1997a) e cultivo de embriões bovinos (BLUME *et al.*, 1997b) e murídeos (BLUME & MARQUES Jr., 1994), e utilizada para conservação de sêmen caprino (NUNES & SALGUEIRO, 1999), ovino (GUERRA & NUNES, 1999), suíno (TONIOLLI *et al.*, 1998), humano (NUNES, 1998) e canino (SILVA *et al.*, 2001).

A ACP adicionada de cafeína poderá ser uma opção eficiente e de baixo custo para tratamentos de capacitação espermática em suínos.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

- Aperfeiçoamento da capacitação espermática *in vitro* na espécie suína.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar as taxas de capacitação espermáticas nos espermatozóides diluídos em ACP ou BTS;
- Avaliar as porcentagens de capacitação espermáticas nos tratamentos suplementados ou não pela cafeína;
- Comparar dois diferentes protocolos de conservação dos espermatozóides, com processamento do sêmen a fresco ou refrigerado por 24 horas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 COLETA E PREPARAÇÃO DO SÊMEN

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal do Departamento de Reprodução Animal da Universidade de São Paulo, localizado na capital paulista.

Foram utilizados três varrões mestiços das raças Landrace e Duroc, com 12 a 14 meses de idade, alojados em baias de aproximadamente 8 m², recebendo 3 kg/dia de ração comercial para crescimento (14% PB) e água *ad libitum*.

Foram coletados 18 ejaculados utilizando-se o método da mão enluvada em béquer estéril de 500 mL pré-aquecido em estufa a 38 °C com filtro de algodão acoplado à boca e protegido por copo de coleta. A fração gelatinosa foi desprezada e foram aproveitados apenas os jatos de sêmen da fração rica.

Após a coleta, o sêmen foi levado ao laboratório e examinado quanto às características físicas (volume, aspecto e odor) e morfológicas. A morfologia dos espermatozoides foi avaliada em preparação úmida com formol salina (ANEXO 5), empregando microscopia de interferência diferencial (DIC), adotando-se o seguinte padrão: 1) anormalidades espermáticas totais: até 20%; 2) anormalidades individuais: acrossoma < 5%, cabeça < 5%, colo < 5%, peça intermediária < 5%, gota citoplasmática proximal < 10% e cauda < 10%. Todas as amostras foram analisadas física e morfológicamente após a diluição. Foram utilizados apenas ejaculados com motilidade espermática ≥ 70%.

A preparação do diluidor BTS foi realizada minutos antes de cada coleta. Sete gramas do diluidor em pó foram dissolvidos em 70 mL de água ultra-pura Milli-Q pré-aquecida a 38 °C (ANEXO 2). Quatro gramas de água de coco em pó foram dissolvidos em 35 mL de água ultra-pura Milli-Q pré-aquecida e ressuspensa em 35

mL de uma solução de citrato de sódio a 1% acrescida de 0,14 g de gentamicina (ANEXO 2), momentos antes da coleta.

Os tubos com o sêmen *in natura* foram processados imediatamente após a coleta. Os outros tubos, a serem refrigerados, foram mantidos em temperatura ambiente (cerca de 25°C) por duas horas. Após este período, os tubos foram refrigerados a 16°C por 24 horas, e depois de decorrido o período, processado da mesma forma.

Cerca de 30 mL da fração rica do sêmen *in natura* foram divididos em duas alíquotas de 15 mL, e diluídos em 35 mL de BTS e em 35 mL de ACP, respectivamente, perfazendo um total de 50 mL de cada solução.

Os tubos contendo o sêmen diluído nos dois tratamentos foram centrifugados por oito minutos a 400 G para a separação dos espermatozoides mortos dos vivos, sendo os últimos obtidos no sedimento. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. Em seguida, retiraram-se 2 µl de sêmen do sedimento, que foram diluídos em 100 µl de meio TALP de fecundação (ANEXO 1), para avaliação da motilidade, e 2 µl do mesmo sêmen diluídos em 1000 µl de água de torneira (utilizada aqui apenas como espermicida) para contagem e avaliação da concentração espermática na câmara de Neubauer. A concentração do sêmen foi ajustada para 2×10^7 espermatozoides/mL.

Este ajuste de concentração foi realizado contando-se a média de espermatozoides por mL de sêmen e foi acrescentada uma maior ou menor quantidade de espermatozoides ao tratamento, de modo que esta concentração fosse de 2×10^7 espermatozoides/mL, para padronizar a quantidade de células espermáticas submetidas à capacitação.

5.2 CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

O meio TALP de fecundação (PARRISH *et al.*, 1988) foi preparado uma vez por semana (50 mL). Foram acrescentados ao meio, 30 minutos antes da realização do protocolo, 60 mg de BSA (ANEXO 4), 50 µl de gentamicina (ANEXO 4) e 20 µl de piruvato (ANEXO 4). Em seguida, o meio foi submetido à filtração em poro de 0,22 µm e colocado em estufa de CO₂ para equilíbrio.

Para a capacitação espermática depositou-se em microtubos 1000 µl de meio TALP suplementado por BSA (ANEXO 4), 5 mM de cafeína (ANEXO 3), e o sêmen diluído com a concentração 2×10^7 espermatozoides/mL. Estes foram então incubados em estufa a 38,5 °C com 95% de umidade e 5% de CO₂ por um período de três horas.

Após a incubação, o sedimento dos tubos foi lavado em 1000 µl do mesmo meio TALP, e centrifugados a 400 G por 8 minutos para a eliminação do sobrenadante de forma a retirar a cafeína.

Posteriormente o sedimento dos tubos foi colocado em 1000 µl de paraformaldeído a 4% (ANEXO 5) por um período de 10 minutos para fixação. Após esta etapa, o conteúdo dos tubos foi lavado e centrifugado a 400 G por duas vezes em solução de acetato de amônio (ANEXO 5), pH 9, por 8 minutos.

5.3 AVALIAÇÃO DA REAÇÃO ACROSSÔMICA

Para a confecção das lâminas e avaliação da reação acrossômica, foi realizado esfregaço com 5 µl do sedimento dos tubos que foram centrifugados em solução de acetato de amônio. Foram então secas ao ar, e em seguida imersas em solução corante Coomassie Blue G (LARSON e MILLER, 1999) (ANEXO 3) por dois minutos.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em filete de água corrente, secas ao ar e vedadas com uma fina camada de solução Permout® para evitar a

oxidação do corante, a degeneração dos espermatozóides e permitir leitura posterior.

Foram contados 200 espermatozóides por lâmina. Os que sofreram capacitação espermática, e conseqüentemente a reação acrossômica, apresentaram o acrossoma corado em azul tênue. Aqueles que não sofreram esta reação, tiveram o acrossoma corado em azul intenso (FIG. 1 e 2).

FIGURA 1: Espermatozóide capacitado, com acrossoma corado em azul tênue, e não capacitado, com acrossoma corado em azul intenso (Coloração Coomansie Blue G, aumento de 400 x).

FIGURA 2: Espermatozóides capacitados, com acrossomas corados em azul tênue, e não capacitados, com acrossomas corados em azul intenso (Coloração Coomansie Blue G, aumento de 1000 x).

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000).

Utilizando o aplicativo “Guided Data Analysis”, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, foram transformados (logaritmo na base 10 - $\text{Log}_{10}X$; Raiz quadrada - \sqrt{X} ; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para a descrição dos resultados, foram empregados as médias e os desvios-padrão (média \pm desvio padrão) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvesse transformações possíveis.

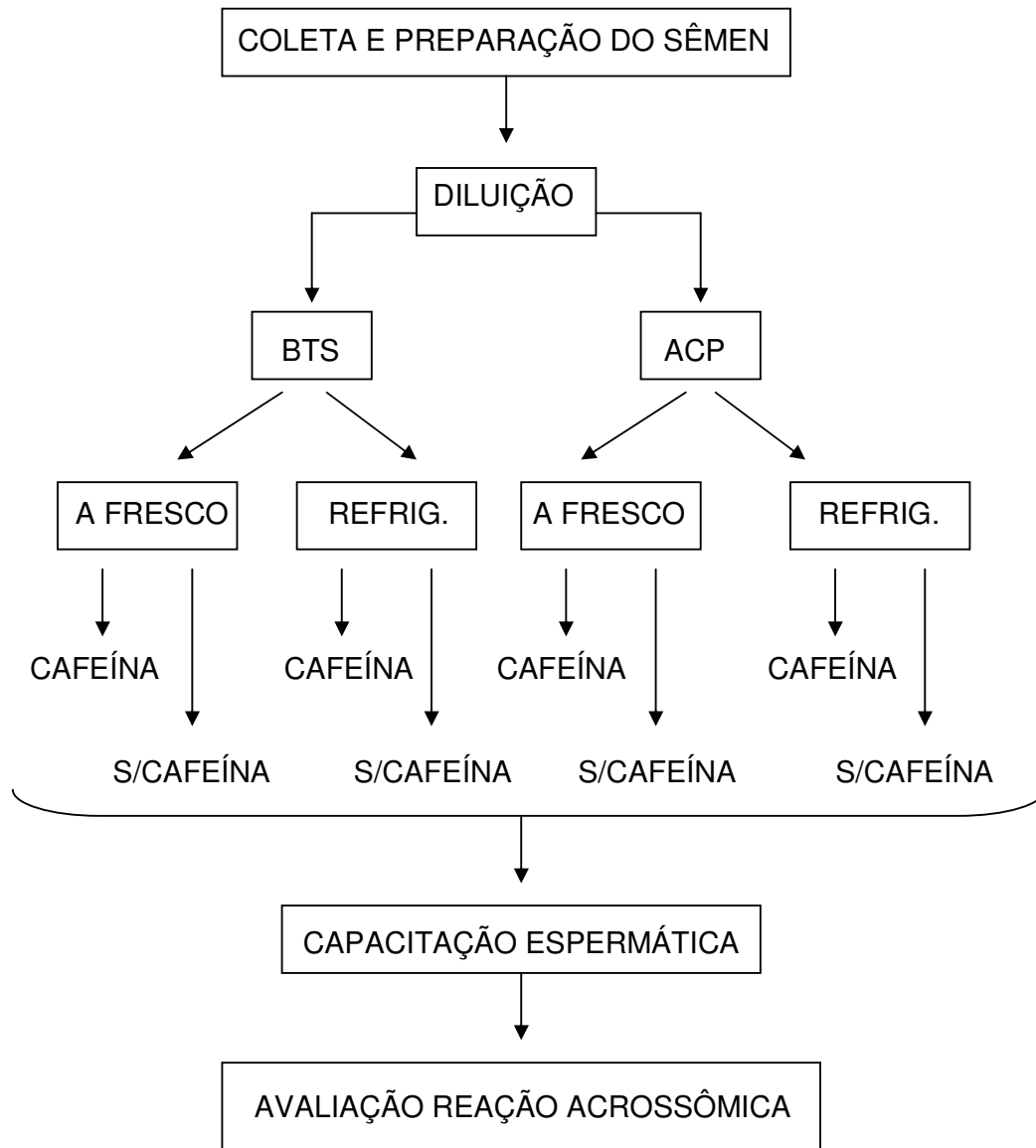
O nível de significância utilizado para rejeitar a hipótese de nulidade (H_0) foi de 5%. As variáveis classificatórias utilizadas foram os tratamentos com o sêmen diluído em ACP ou BTS, com ou sem cafeína, e fresco ou refrigerado. A variável resposta analisada foi a reação acrossômica.

Na análise de variância foram verificados os efeitos dos três tratamentos: ACP X BTS, com cafeína X sem cafeína, *in natura* X refrigerado, assim como as interações entre as mesmas.

Não foi verificado o efeito das interações duplas ou da interação tripla.

A variável resposta porcentagem de espermatozoides que sofreram a reação acrossômica não obedeceu à normalidade dos resíduos, sendo a mesma obtida através da transformação para o logaritmo de seus valores na base 10. Sendo assim, foi empregada a análise de variância paramétrica ONE WAY ANOVA para verificar os efeitos dos tratamentos e o teste Tukey de médias ($p < 0,05$) para verificar diferenças entre os tratamentos (PROC GLM).

5.5 ESQUEMA DO PROTOCOLO



6. RESULTADOS

Em relação à capacitação espermática não houve diferença estatística entre os diluidores BTS e ACP ($p>0,05$), apenas pôde-se observar diferença com relação à presença ou ausência de cafeína ($p<0,05$), e com relação ao processamento sêmen a fresco ou refrigerado ($p<0,05$).

Todos os resultados do trabalho podem ser aferidos na TABELA 1.

TABELA 1: Taxas médias (%) e desvios-padrão de espermatozóides capacitados, diluídos em BTS ou ACP, no sêmen processado a fresco ou refrigerado, com ou sem adição de cafeína, detectados pela coloração Coomansie Blue G.

TRATAMENTOS	A FRESCO +		REFRIG. +	
	A FRESCO	CAFEÍNA	REFRIG.	CAFEÍNA
BTS	4,8 ± 3,1 ^{Aa*}	23,4 ± 15,5 ^{Bb*}	18,3 ± 17 ^{Cc*}	48,1 ± 20,3 ^{Dd*}
ACP	4,6 ± 2,8 ^{Aa*}	22,3 ± 16,9 ^{Bb*}	18,2 ± 14,1 ^{Cc*}	43,7 ± 19 ^{Dd*}

Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa entre adição ou não de cafeína ao tratamento ($p<0,05$).

Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa entre o sêmen processado a fresco ou refrigerado ($p<0,05$).

Asterisco (*) na mesma coluna indica que não houve diferença significativa entre os diluidores ($p>0,05$).

No tratamento com o sêmen a fresco em que foi utilizada a solução à base de ACP com cafeína foi observada uma média de 22,3% de espermatozóides capacitados. Na ausência de cafeína ao sêmen diluído em ACP foram verificados apenas 4,6% de capacitação espermática ($p<0,05$).

Resultados semelhantes foram observados nos tratamentos em que o sêmen foi diluído em BTS. Com a adição de cafeína, verificou-se 23,4% de espermatozóides capacitados, enquanto na ausência do reagente as taxas de capacitação no BTS caíram para 4,8% ($p < 0,05$).

No diluidor à base de ACP refrigerado houve também diferença significativa. As taxas de capacitação *in vitro* incluindo a cafeína foram de 43,7% e na sua ausência caíram para somente 18,2% ($p < 0,05$).

Como terceira variável testada, observaram-se as diferenças ocorridas entre as porcentagens de espermatozóides capacitados após o processamento a fresco ou com 24 horas de refrigeração a 16°C ($p < 0,05$).

No sêmen a fresco diluído em BTS ou em ACP sem cafeína, as taxas foram de apenas 4,8 e 4,6% de espermatozóides capacitados, enquanto refrigerados, estas subiram para 18,3 e 18,2%, respectivamente ($p < 0,05$).

Também houve aumento significativo na capacitação espermática quando houve refrigeração no sêmen diluído em BTS e em ACP, o primeiro apresentou médias de 48,1% e o segundo 43,7%, enquanto a fresco o BTS apresentou 23,4% e o ACP 22,3% de espermatozóides capacitados ($p < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados deste trabalho, ao se comparar o sêmen diluído em BTS ou em ACP, pôde-se verificar que ambos apresentaram resultados semelhantes, sem diferença estatística significativa em relação às taxas de capacitação espermática ($p > 0,05$).

Como não havia sido observado nenhum trabalho em literatura tratando da água de coco na capacitação espermática, criou-se a expectativa de que a mesma pudesse possibilitar resultados de sucesso, já que em trabalhos com outras biotécnicas, isto foi possível.

A água de coco se mostrou uma solução eficiente na preservação do sêmen suíno. Trabalhando com esta, sob a forma *in natura* e estabilizada, TONIOLLI *et al.* (1998) analisaram as características de motilidade progressiva individual e porcentagem de espermatozóides móveis e foram observados resultados superiores com as duas formas testadas, em relação à utilização do BTS.

A ACP tem sido utilizada com sucesso na conservação de sêmen caprino (SALGUEIRO *et al.*, 2002) e eqüino (SAMPAIO NETO *et al.*, 2002).

Dentro dessa expectativa, a água de coco foi utilizada neste trabalho sob a forma desidratada (em pó), que já foi utilizada com sucesso na conservação de sêmen caprino e eqüino (SALGUEIRO *et al.*, 2002; SAMPAIO NETO *et al.*, 2002).

Entretanto, não foram observados resultados superiores da ACP em relação ao BTS, na capacitação espermática, como haviam sido observados apenas na preservação do sêmen suíno (TONIOLLI *et al.* 1998).

Ao se comparar a água de coco sob as formas *in natura* e desidratada, pode-se observar algumas desvantagens no uso da primeira, a começar pela dificuldade

no transporte e armazenamento dos frutos, que requerem muito espaço e refrigeração. No caso da forma desidratada não há este tipo de limitação, além disso, cria-se a possibilidade do seu uso em regiões onde o fruto não está disponível.

Apesar de não se observar neste trabalho diferença significativa entre os dois diluidores, nos tratamentos de capacitação espermática, pode-se considerar uma certa vantagem na utilização de ACP, pois se deve levar em consideração a questão econômica. A ACP pode ser mais acessível do que um produto importado. Além disso, é importante ressaltar o fato de se tratar de uma matéria-prima renovável, não-poluente e abundante em nosso país.

Adicionalmente, vale pontuar a elevada segurança sanitária proporcionada pelo produto, já que desidratado oferece menos riscos de carrear agentes patógenos ao sêmen e aos meios de fecundação e cultivo.

No presente trabalho, a escolha da cafeína para induzir a capacitação espermática, foi feita com base em diversos relatos em que foi utilizada com sucesso (WANG *et al.*, 1991; FUNAHASHI e NAGAI, 2001; OLIVEIRA, 2002) em diferentes concentrações e períodos de incubação.

Em trabalhos utilizando concentrações de cafeína de 2mM e 5mM em que foram adicionadas quantidades crescentes de heparina, os resultados demonstraram que quanto mais se incluiu heparina ao meio FIV a eficácia da cafeína foi diminuindo, ou seja, a heparina teve efeito negativo na penetração espermática dos oócitos suínos (WANG *et al.*, 1991).

Confirmando resultados da literatura, a presença de cafeína nos tratamentos foi essencial para otimizar a capacitação espermática em suínos (WANG *et al.*, 1991; FUNAHASHI e NAGAI, 2001; OLIVEIRA, 2002). Porém, não é possível afirmar que apenas na sua adição está o fator preponderante para se obter a capacitação espermática, já que todos os procedimentos químicos ou físicos que desestabilizem a membrana plasmática dos espermatozoides preparam-no para a reação acrossômica (PAVLOK, 1981).

Assim sendo, as etapas de lavagem por centrifugação, pré-incubação e, claro, a adição de cafeína, são responsáveis pela capacitação espermática e podem ter influenciado os resultados.

Sinais característicos de capacitação, como a hiperativação, hiperflagelação e aglutinação cabeça-a-cabeça em bovinos (GARBERS *et al.*, 1971) e em gatos (STACHECKI *et al.*, 1994), foram observados com a adição de cafeína no presente trabalho.

Entretanto, foram observados em outros trabalhos, alguns efeitos nefastos aos espermatozóides capacitados por este reagente (REES *et al.* 1990; ARAÚJO *et al.*, 2000). Estes autores, utilizando um sistema de análise computadorizada de motilidade (CASA) (REES *et al.* 1990), e utilizando a técnica de estromboscopia (ARAÚJO *et al.*, 2000) observaram declínio da motilidade progressiva, movimento anormal (titubeante) e batimento lateral da cauda em espermatozóides de carneiros.

MAXWELL *et al.* (1995), trabalhando com sêmen congelado também dessa espécie, utilizou concentrações crescentes de 0 a 8 mM de cafeína e observaram declínio na porcentagem de espermatozóides móveis e alterações em sua linearidade.

Estes resultados permitem hipotetizar que a cafeína pode ser utilizada com êxito na espécie suína, porém em ovinos esta alternativa não apresenta a mesma viabilidade.

É importante considerar, no presente trabalho, que mesmo nos tratamentos em que não se utilizou a cafeína, houve capacitação espermática. Isto pode ser explicado pelo fato de que mesmo sem a adição de reagentes capacitantes, esta reação pode ocorrer por meio da incubação dos espermatozóides em meios definidos suplementados por BSA (VISCANTI e KOPF, 1998).

Com relação à utilização de espermatozoides a fresco e refrigerados, observou-se diferença significativa favorável à utilização do sêmen refrigerado por 24 horas a 16°C para maiores taxas de capacitação espermática.

Com base na premissa de que toda e qualquer manipulação dos espermatozoides favorece a desestabilização da membrana plasmática, é razoável considerar que o sêmen refrigerado tenha apresentado melhores resultados do que o sêmen a fresco.

Assim, no presente trabalho, a suplementação por BSA pode ter induzido a capacitação espermática, porém em taxas inconsistentes e muito discretas quando comparadas àquelas verificadas com a suplementação pela cafeína e refrigeração.

8. CONCLUSÕES

A ACP associada à cafeína é uma opção viável, econômica e eficiente para a diluição do sêmen a ser submetido a procedimentos de capacitação espermática.

O sêmen refrigerado a 16 °C por 24 horas pode ser utilizado para tratamentos de capacitação espermática em suínos.

9. PERSPECTIVAS

A difusão de biotecnologias alternativas, caracterizadas pela simplicidade e baixo custo, poderão contribuir para a criação de novos protocolos de capacitação espermática *in vitro* em suínos.

Além disso, seria interessante a utilização da ACP em etapas como a maturação oocitária e cultivo embrionário, que precisam ser aperfeiçoadas para a plena utilização da produção *in vitro* de embriões suínos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*, v.48, p.537-544, 1997.

ARAÚJO, A.A. *Effet de la caffeine sur la motilité des spermatozoids de bélier*. Université François Rabelais. 81p. p.43-45, *Tese (Doutorado em Ciências da Vida)*, 2000.

AUSTIN, C.R. Observations on the penetrations of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.*, v.4, p.581-596, 1951.

BARBIER-BRYGOO, H.; Tracking auxin receptors using functional approaches. *Crit. Rev. Plant.*, v.14, p.1-25, 1995.

BLUME, H.; VALE FILHO, V.R.; MARQUES JR, A.P.; SATURNINO, H.M.; Avaliação da água de coco na maturação de oócitos bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v.21, p.72-75, 1997a.

BLUME, H.; VALE FILHO, V.R.; MARQUES JR, A.P.; SATURNINO, H.M.; Avaliação da água de coco no cultivo de oócitos bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v.21, p.79-81, 1997b.

BLUME, H.; MARQUES JR, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v.18, p.97-104, 1994.

BOUCHARD, G. F., MORRIS, J. K., SIKES, J. D. Effect of storage temperature cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*, v.34, n.1, p.147-158, 1990.

CAMERON, R.D.A. Porcine reproduction now and in the future. In: *Intern. Pig Veter. Society Congress*, Birmingham, 15, 1998. Proceedings, p.209-218.

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

CHENG, W.T.K. *In vitro* fertilization of farm animal oocytes. *PhD Thesis*. AFRC Institute of Animal Physiology, Cambridge, UK, 1985.

CROSS, N.L., Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, v.59, p.7-11, 1998.

FERREIRA, M.A.L.; BRASIL, A.F., SILVA, J.R.V.; ANDRADE E.R., RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; Effects of storage time and temperature on atresia of

goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. *Theriogenology*, v.55, p.1607-1617, 2001.

FLESH, F.M.; COLENBRANDER, B.; LAMBERT, M.G.G.; GADELA, B. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem.Biophys. Commun.*, v.262, n.3, p.787-792, 1999.

FUNAHASHI, H.; NAGAI, T. Regulation of in vitro penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Mol. Reprod. Dev.*, v.58, p.424-431, 2001.

FUNAHASHI H.; FUJIWARA, T.; NAGAI, T. Modulation of the function of boar spermatozoa via adenosine and fertilization promoting peptide receptors reduce the incidence of polyspermic penetration into porcine oocytes. *Biol. Reprod.*, v.63, p.1157-1163, 2000.

GALSTON, A.W.; PURVES, W.K. The mechanism of action of auxin. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, v.11, p.239-276, 1960.

GARBERS, D.L.; FIRST, N.L.; SULLIVAN, J.J.; LARDY, H. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. *Biol. Reprod.*, v.5, p.336-339, 1971.

GUERRA F.F.A; NUNES, J.F.; Fertilidade in vivo e avaliação in vitro do sêmen ovino resfriado e conservado em água de coco por 72 horas. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v.23, p.287-289, 1999.

HARAYAMA, H.; MAGARGEE, S.F.; KUNZE, E.; SHIDARA, O.; IWAMOTO, E.; ARIKAWA, S.; MIYAKE, M.; KATO, S.; HAMMERSTEDT, R.H. Changes in epididymal protein anti-agglutinin on ejaculated boar spermatozoa during capacitation *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.11, n.4, p.193-199, 1999.

HUNTER, R.H.F.; NICHOL, R. Capacitation potential of the fallopian tube: a study involving surgical insemination and the subsequent incidence of polyspermy. *Gamete Res.*, v.21, p. 255-266, 1988.

KANE, M.T.; CARNEY, E.W.; ELLINGTON, J.E. The role of nutrients, peptide growth factors and co-culture cells in development of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology*, v.38, p.297-313, 1992.

LARSON, J.L.; MILLER, D.J. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol. Repr. Dev.*, v.52, p.445-449, 1999.

LETHAM, O.S. Regulators of all division in plant tissues, and the cytokinins of coconut milk. *Physiol. Plant.*, n.32, p.66-70, 1974.

LIM, J.G.; KIM, N.H.; LEE, H.T.; CHUNG, K.S.; Effects of extracellular potassium concentrations on acrosome reaction and polyspermy during in vitro fertilization and subsequent development in vitro in the pig. *Theriogenology*, v.48, p.843-851, 1997.

MARIANO, M. S., WENTZ, I, GUIDON, A L. Sêmen suíno com diferentes resistências à conservação no estado líquido e ao congelamento: Características biológicas. *Rev. Bras. Rep. Animal.*, v.16, n.3-4, p.14 -16, 1992.

MAXWELL, W.M.; ROBINSON, S.J.; ROCA, J.; MOLINIA, F.C.; SANCHEZ-PARTIDA, L.G.; EVANS, G. Motility, acrosome integrity and fertility of frozen ram spermatozoa treated with caffeine, pentoxifylline, cAMP, 2-deoxyadenosine and kallikrein. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.7, p.1081-1087, 1995.

MINAMI, N; UTSUMI, K.; IRITANI, A. Oviductal influences and embryo development in mice. *J. Reprod. Fertil.*, v.96, p.735-745, 1992.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y.; PRISCILA, L.; Utilisation d'une substance active "JYP" presente dans l'eau de coco pour la conservation in vitro et la fertilité des spermatozöids des mammifère. *S. I., s,n*, 1994.

NUNES, J.F.; Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais de animais domésticos e do homem. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v.22, p.109-112, 1998.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.; Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. *Rev. Cient. Prod. Animal*, v.1, p.17-26, 1999.

OLIVEIRA, V.P. *Estudo in vitro da capacitação espermática e desenvolvimento de embriões em suínos*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. 49p. *Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)*, 2002.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, v.38, n.5, p.1171-1180, 1988.

PAVLOK, A. Penetration of hamster and pig zona-free eggs by boar ejaculated spermatozoa preincubated *in vitro*. *Int. J. Fertil.*, v. 26, p. 101-106, 1981.

PINTADO ,B.; DE LA FUENTE , J.; ROLDAN , E. R. S . 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.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT,A.; WHITE, G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehyds of mammalian spermatozoa. *Comp. Biochem Phistol.*, v.4613, p.541-549, 1973.

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A; RAMPACEK, G. B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.*, v.34, n. 2, p. 278-283, 1972.

REES, J.M.; FORD, W.C.L.; HULL, M.G.R. Effect of caffeine and pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v. 90, p.147-156, 1990.

SCHEID, I. R., WENTZ, 1, BERTANI, *Get al*. Comparação entre diluentes para conservação de sêmen suíno no estado líquido: resultados "in vitro". *CONGRESSO*

BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1991, Águas de Lindóia. Anais ... Águas de Lindóia: ABRAVES, 1991, P. 122.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA K.P.L.; VIEIRA, V.E.; GONDIM, J.M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes a base de água de coco in natura e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, supl.5, p. 96-98, 2002.

SAMPAIO NETO, J.C.; SALGUEIRO, C.C.M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J.F. Utilização do diluente ACP-105 na refrigeração do sêmen eqüino. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, supl.5, p.137-139, 2002.

SILVA, J.R.V.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A; BÁO, S.N.; COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in vitro. *Theriogenology*, v.54, p.809-822, 2001.

STACHECKI, J.J.; GINSBURG, K.A.; ARMANT, D.R. Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline, and 2-deoxyadenosine. *J. Androl.*, v.15, p.157-164, 1994.

TONIOLLI, R.; BUSSIÈRE, J.; COUROT, M.; MAGISTRINI, M.; COMBARNOUS, Y.; Effect of indole-3-acetic-acid (plant auxin) on the preservation at 15°C of boar semen for artificial insemination. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.36, p.503-511, 1996.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M.; CAVALCANTE, S.G.; Avaliação in vitro do sêmen suíno diluído em PBS e na água de coco in natura e estabilizada. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, v.22, p.198-201, 1998.

TOPFER-PETERSEN, E.; PETROUKINA, A.M.; EKHLASI-HANDRIESER, M. Oocyte-sperm interactions. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60/61, p. 653-662, 2000.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, D. T.; LOVE, C. L. Effects os semen ftactionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v. 28, n.5, p. 709-723, 1987.

VÁSQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.; ROCA, J.; COY, P.; PASTOR, L.M.; Acrosome Reaction of Boar Spermatozoa in Homologous In Vitro Fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, v.36, p.84-88, 1993.

VISCONTI, P.E.; GALANTINO-HOMER, H.; NING, X.P.; JORGEZ, C.J.; ALVAREZ, J.G.; KOPF, K. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian. *The J. Biol. Chem.*, v.274, n. 4, p.3235-3242, 1999.

VISCONTI, P.E. , KOPF, G.S. Regulation of protein phosporylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, v.59., p.1-6,1998.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; J. (Eds), *The Physiol. Reprod.* New York: Raven Press, p.189-317, 1994.

WANG, W. H.; NIWA, K.; OKUDA K.; In-Vitro penetration of pig oocytes matured in culture by frozen-thawed ejaculated spermatozoa. *J.Reprod. Fertil.*, v.93, p.491-496,1991.

WATSON, P. F.; PLUMMER, J. M.; J. M. The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling, IN: *INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN*, UPPSALA. Proceedings ... Uppsala: p 113-125, 1985.

11. ANEXOS

ANEXO 1

SOLUÇÕES ESTOQUE

MEIO TALP DE FECUNDAÇÃO (PARRISH *et al.*, 1988)

REAGENTE	TALP STOCK
	50 ML
NaCl	0,3330
KCl	0,0120
MgCl ₂	0,0050
NaH ₂ PO ₄	0,00205
NaHCO ₃	0,1050
CaCl ₂ H ₂ O	0,0150
Phenol Red	0,0005
Ac. Láctico Syr.	71,5 µl
	pH: 7,4 OSM: 295-300

ANEXO 2**SOLUÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO**

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO
Água de coco	50%
Citrato de sódio 5%	25%
Água ultra-pura	25%

SOLUÇÃO BTS (BELTSVILLE THAWING SOLUTION)

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO
BTS em pó	50%
Água ultra-pura	50%

ANEXO 3**SOLUÇÃO DE CAFEÍNA**

	CONCENTRAÇÃO	COD. SIGMA
Cafeína	0,0971g	C-0750
TL-STOCK	5mL	

COLORAÇÃO COOMANSIE BLUE G (LARSON e MILLER, 1999)

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO	CÓDIGO
Metanol	5mL	A1. 096 Synth
Ácido Acético Glacial	10mL	ACS
Água	25mL	
Coomansie Blue G	0,11g	Sigma B-5133

ANEXO 4

SOLUÇÃO DE GENTAMICINA

Sulfato de Gentamicina	Sigma G-1264	50 mg
Solução fisiologica		100 mL

Aliquotar e armazenar a – 20°C

SOLUÇÃO DE PIRUVATO

Ácido Piruvico	Sigma P-3662	22 mg
Água destilada		10 mL

Aliquotar e armazenar a – 20°C

MEIO TALP FIV FINAL (10 ML)

Solução estoque (FIV)		10 mL
BSA (FAF)	Sigma A-7888	60 mg
Solução de Gentamicina	Sigma G-1264	50 mg
Solução de Piruvato	Sigma P-3662	20 mg

ANEXO 5

SOLUÇÃO DE PARAFORMALDEIDO A 4%

Paraformaldeido	32 g
PBS	1000 mL

Ph 7,4

SOLUÇÃO DE ACETATO DE AMÔNIO

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO	CÓDIGO
Acetato de Amoneo	7,78g	A-7330
Agua	1000 mL	

Ajustar pH com solução de NaOH 5 M

Armazenar sob refrigeração

SOLUÇÃO SALINA FORMOLADA

Solução Salina	97mL
Formol	3mL

Preparar para uso imediato