JOÃO DIEGO DE AGOSTINI LOSANO

Efeito do tratamento antioxidante sistêmico em touros *Bos taurus taurus* submetidos ao estresse térmico e suplementados com dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados sobre a capacidade de ligação de espermatozóides à membrana vitelínica de ovos de galinha

São Paulo

2013

JOÃO DIEGO DE AGOSTINI LOSANO

Efeito do tratamento antioxidante sistêmico em touros *Bos taurus taurus* submetidos ao estresse térmico e suplementados com dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados sobre a capacidade de ligação de espermatozóides à membrana vitelínica de ovos de galinha

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe

De acordo:_____

Orientador

São Paulo
2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2874
FMVZ

Losano, João Diego de Agostini
Efeito do tratamento antioxidante sistêmico em touros *Bos taurus taurus* submetidos ao estresse térmico e suplementados com dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados sobre a capacidade de ligação de espermatozóides à membrana vitelínica de ovos de galinha. / João Diego de Agostini Losano. -- 2013.
106 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe.

1. Sêmen. 2. Touros *Bos Taurus taurus. 3.* Teste de ligação de espermatozoides. 4. Vitamina E. 5. Ácidos graxos poliinsaturados. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do tratamento antioxidante sistêmico em touros *Bos taurus taurus* submetidos ao estresse térmico e suplementados com dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados sobre a capacidade de ligação de espermatozóides à membrana vitelínica de ovos de galinha", protocolado sob o nº 2329/2011, utilizando 16 (dezesseis) touros, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Effect of systemic antioxidant treatment in *Bos taurus taurus* bulls under heat stress and supplemented with polyunsaturated fatty acids on sperm binding capacity to the chicken egg perivitelline membrane", protocol number 2329/2011, utilizing 16 (sixteen) bulls, under the responsibility Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 2 de agosto de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LOSANO, João Diego de Agostini

Título: **Efeito do tratamento antioxidante sistêmico em touros *Bos taurus taurus* submetidos ao estresse térmico e suplementados com dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados sobre a capacidade de ligação de espermatozóides à membrana vitelínica de ovos de galinha**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências

DATA___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Dedicatória

Dedico esta dissertação,

À Deus que sempre guiou os meus passos me dando forças para vencer os obstáculos da vida, e me deu sabedoria para usa-los como uma maneira de fortalecimento e para me tornar uma pessoa melhor.

A minha mãe Lucimara de Agostini, que sempre me apoiou em todas as fases da minha vida, que sempre faz de tudo para dar o melhor para mim e que me ensinou a honestidade, humildade, perseverança, respeito ao próximo e fé em Deus. Todas as minhas conquistas devo a ela, e tudo que faço é para deixa-la orgulhosa.

Aos meus avôs Álvaro de Agostini e Maria Eunice Andrade de Agostini que sempre me apoiaram muito e me acolheram nos momentos em que mais precisei.

A todos os meus familiares que também sempre me apoiaram e sempre se preocuparam comigo.

Agradecimentos

Nesta importante etapa da minha vida, tive o privilégio de conhecer tantas pessoas especiais que me ajudaram diretamente e indiretamente, que seria complicado dedicar este trabalho e agradecer a todos. Se por acaso eu me esquecer de citar alguém peço desculpas, mas todos que passaram pela minha vida sabem que são especiais para mim. De qualquer forma agradeço a todos pela amizade, companheirismo e compreensão.

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção, força, por iluminar os meus passos diariamente e por proporcionar ótimos momentos na minha vida mesmo que muitas vezes eu não merecesse. Sem Ele não teria chegado até aqui, portanto devo tudo a Ele.

À minha mãe Lucimara de Agostini, meus avôs Álvaro de Agostini e Maria Eunice Andrade de Agostini, minha prima Nayara de Agostini, que é como uma irmã para mim, e todos os meus familiares que sempre me apoiaram, se preocuparam comigo e que serviram de exemplo e inspiração para que eu pudesse me tornar o que sou hoje. Amo vocês de todo o meu coração.

Aos meus orientadores e grandes mestres da reprodução animal Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe e Prof. Dra. Valquíria Hyppolito Barnabe, por me receberem de portas abertas no Laboratório de Andrologia e por darem essa oportunidade única em minha vida. Agradeço a vocês de coração.

Ao Marcilio por também me orientar, por todos os ensinamentos e pela amizade. Considero você um grande amigo, e muito do que eu aprendi e conquistei durante esta etapa devo a você, obrigado por toda a ajuda e companheirismo.

A toda equipe do Laboratório de Andrologia: Eduardo, Andressa, Carol, João Rafael por sempre me ajudarem nos momentos que mais precisei, pela amizade e exemplo de ótimos profissionais. Devo muito a vocês.

À Profa. Dra. Camila Infantosi Vannucchi por me dar a oportunidade de realizar o estágio do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino na sua disciplina, pela amizade e pelos ensinamentos.

À Professora Dra. Mayra Helena Ortiz D'Avila Assumpção e ao Dr. Ricardo Pimenta Bertolla que aceitaram participar como membros da banca examinadora da minha defesa de mestrado.

À Thelma Santos Criscuolo, Daniel, André Monteiro da Rocha, Prof. Ricardo e Maíra por ajudarem ativamente no meu experimento. Sem a ajuda de vocês não seria possível concluí-lo.

Ao Daniel, Brunão e Givago pela amizade verdadeira, companheirismo e pelas noites de Poker jogadas na casa do Marcilio.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal Profa. Dra. Camila Infantosi Vannucchi,Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira, Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Prof. Dr. José Antônio Visintin, Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, Profa. Dra. Mayra Helena Ortiz D'Avila Assumpção, Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes, Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi, Prof. Dr.

Mário Binelli, Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade e Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda pelos preciosos ensinamentos.

A todos os amigos do departamento de reprodução animal (VRA) da FMVZ-USP pela amizade, parcerias em experimentos e churrascos.

Aos amigos de Pirassununga Kleber, Henrique, Miltão, Thiago, Roney, Everton, Roberta, Mari, Milena, Bruna e Dani.

Aos funcionários do VRA Harumi, Miguel, Claudia, Thais, Roberta, Luiz, Irailton, Belau, Dona Sandra e Jocimar.

A todos os funcionários da biblioteca da FMVZ e da comissão de pós-graduação pela ajuda nas horas que mais precisei.

À Universidade de São Paulo e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia desta mesma instituição que permitiram que eu fizesse o mestrado na melhor universidade da América latina e uma das melhores do mundo.

Ao Departamento de Reprodução Animal (VRA) que permitiu que eu realizasse um sonho de poder fazer o mestrado em reprodução animal, área na qual tenho paixão em atuar.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) que proporcionou a bolsa que me ajudou muito durante esta importante etapa da minha vida.

Ao Fundo de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP) por financiar a maior parte deste experimento.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) e todos os professores que passaram seus conhecimentos e permitiram que eu me formasse em Medicina Veterinária, profissão na qual me orgulho de ter escolhido. A formação que vocês me deram me proporcionou a oportunidade de chegar até aqui.

A ex-professora da UFPR e atual professora da FMVZ- USP Viviane Gomes por ter me aconselhado e indicado para eu fazer meu estágio curricular no VRA, no qual abriu as portas para que eu pudesse entrar no mestrado. Você me ensinou muito profissionalmente e na minha vida pessoal.

Aos meus grandes amigos de faculdade Guilherme (Tião), Guilherme (Rio Preto), Kleber, João Vicente, Raul, Pipo, Vini, Zé, Góes, Júlio, Gleisson, Garfo, Daniel, Rodrigo, Custódio, Jovani, Paulinho, Alan e entre outros que apesar da distância após a formatura foram muito importantes na minha vida, e parte do que sou e do que estou vivenciando neste momento devo a eles.

RESUMO

LOSANO, J. D. A. **Efeito do tratamento antioxidante sistêmico em touros *Bos taurus taurus* submetidos ao estresse térmico e suplementados com dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados sobre a capacidade de ligação de espermatozóides à membrana vitelínica de ovos de galinha.** [Effect of systemic antioxidant treatment in Bos taurus taurus bulls under heat stress and supplemented with polyunsaturated fatty acids on sperm binding capacity to the chicken egg perivitelline membrane]. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Diversos estudos indicam que touros europeus (*Bos taurus*) apresentam uma maior susceptibilidade ao estresse térmico com um consequentemente aumento do estresse oxidativo. Este, por sua vez, leva a uma diminuição na qualidade espermática. O espermatozoide possui, fisiologicamente, uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) em sua membrana. As ligações duplas entre carbonos desses PUFAs confere a membrana plasmática uma maior fluidez, necessária aos processos fisiológicos do espermatozoide como motilidade e fertilização. No entanto essas ligações são mais facilmente oxidadas e, portanto, mais susceptíveis a peroxidação lipídica. Sendo assim, a suplementação com PUFAs promoveria uma melhoria na qualidade espermática, porém, tornaria o espermatozoide ainda mais susceptível à peroxidação lipídica. A vitamina E é um antioxidante chave na prevenção do estresse oxidativo através da interceptação do radical hidroxila, protegendo os PUFAs da membrana espermática contra a peroxidação lipídica. Portanto, uma alternativa para melhorar a qualidade espermática de touros europeus submetidos ao estresse térmico, seria a suplementação com PUFAs associada a um tratamento com vitamina E para prevenir um possível efeito deletério oxidativo desses ácidos graxos. Estudos sugerem uma importante relação entre os testes convencionais de avaliação de sêmen e fertilidade. No entanto, a limitação destes testes também tem sido reconhecida, principalmente em casos de infertilidade idiopática. Estudos demonstram que os testes funcionais de avaliação do sêmen, podem ser uma alternativa importante para a avaliação da capacidade fecundante de uma determinada amostra seminal. A interação entre espermatozóide e zona pelúcida ocorre através da ligação de receptores acrossomais às proteínas ZP3 e ZP2 do

oócito. A membrana perivitelínica de ovos de galinha possui uma homologia com essas proteínas, permitindo sua ligação com espermatozóides de diversas espécies. Sendo assim, o teste de ligação espermática a essa membrana parece ser bastante eficiente para avaliar a capacidade fecundante do sêmen. No presente estudo, 16 touros *Bos taurus* foram submetidos à insulação testicular durante 4 dias e submetidos a um arranjo fatorial 2x2, sendo os fatores: dieta rica em PUFAs (Megalac®, 4 Kg ao dia) e tratamento com Vitamina E (Monovin E®, 3000 UI a cada 13 dias) durante 60 dias. As amostras seminais criopreservadas/descongeladas foram submetidas à avaliação da análise computadorizada da motilidade (CASA; Hamilton Thorne, Ivos 12.3, USA), integridade de membrana (Eosina Nigrosina), integridade acrossomal (Fast Green – Rosa Bengala), atividade mitocondrial (3'3 diaminobenzidina), susceptibilidade ao estresse oxidativo (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS), integridade de DNA (SCSA) e o teste de ligação de espermatozóides à membrana vitelínica de ovos de galinha, que foi previamente padronizado. O tratamento com vitamina E apresentou efeitos benéficos para algumas características espermáticas, sendo o contrário observado pelo tratamento com PUFAS, quando ambos foram analisados isoladamente. No entanto, a associação entre estes tratamentos não foi eficiente para melhorar a qualidade espermática assim como a capacidade fecundante avaliada através do teste de ligação espermática em membrana perivitelínica de ovos de galinha.

Palavras-chave: Sêmen. 2. Touros *Bos Taurus taurus. 3.* Teste de ligação de espermatozoides. 4. Vitamina E. 5. Ácidos graxos poliinsaturados.

ABSTRACT

LOSANO, J. D. A. **Effect of systemic antioxidant treatment in Bos taurus taurus bulls under heat stress and supplemented with polyunsaturated fatty acids on sperm binding capacity to the chicken egg perivitelline membrane.** [Efeito do tratamento antioxidante sistêmico em touros *Bos taurus taurus* submetidos ao estresse térmico e suplementados com dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados sobre a capacidade de ligação de espermatozóides à membrana vitelínica de ovos de galinha]. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Several studies suggest a high susceptibility of European bulls (*Bos taurus*) to the heat stress, which will lead to an increase on oxidative stress and consequent impairment on sperm viability. Sperm membranes are rich in poly-unsaturated fatty acids (PUFAs). The carbon-carbon double bounds (insaturations) that characterize these PUFAs confer the necessary fluidity to the sperm membrane, essential to motility and fecundation capacity. However, these insaturations are more unstable and, therefore, more susceptible to the lipid peroxidation (i.e., attack of reactive oxygen species to the lipids). Hence, PUFA supplementation would improve certain sperm characteristics but increase the already high susceptibility to the oxidative stress. Vitamin E is a key antioxidante on oxidative stress prevention by intercepting hydroxyl radical and protecting sperm membrane PUFAS against lipid peroxidation. Therefore, an alternative to improve sperm quality in heat stressed european bulls would be a PUFA supplementation associated to a Vitamin E therapy in order to avoid a possible deleterious oxidative effects of these fatty acids. Estudies suggest an important relationship between conventional tests for sperm evaluation and fertility. However, limitations have been also verified, especially in cases of idiopathic infertility. Thus, tests to evaluate sperm functionality may be an interesting alternative to assess fecundation capacity of semen samples. The binding of sperm to the zona pellucida occurs initially by the interaction between acrosomal receptors and oocyte proteins ZP3 and ZP2. The perivitelline membrane of chicken eggs present homologies to zona pellucida proteins, which allows sperm from several species to bind to this membrane. Thus, the sperm binding test to the perivitelline membrane may be an efficient method to asses the fecundation capacity in semen of bulls. In the present study, 16 *Bos taurus* bulls were submitted to testicular insulation for 4 day. Animals were then submitted to a 2x2 factorial design, with the factor

represented by a PUFA oral supplementation (Megalac®, 4 Kg for day) and the treatment with Vitamin E (Monovin E®, 3000 UI, each 13 days) for 60 days. Samples were cryopreserved/thawed and analyzed for motility variables by the computer assisted sperm analysis (CASA; Hamilton Thorne, Ivos 12.3, USA), membrane integrity (Eosin / Nigrosin), acrosome integrity (Fast Green / Bengal Rose), mitochondrial activity (3'3 diaminobenzidine), susceptibility to the oxidative stress (tiobarbituric acid reactive substances - TBARS), DNA integrity (SCSA) and the sperm binding test to the chicken egg perivitelline membrane, which was previously validated. Results demonstrated a beneficial effect of Vitamin E on some sperm characteristics, with the inverse effect observed for PUFA when both treatments were considered individually. However, the association between both treatments were not efficient to improve sperm quality as well as the fecundation capacity as evaluated by the sperm binding test to the chicken perivitelline membrane.

Keywords: Semen. Bulls *Bos Taurus taurus.* Sperm binding test. Vitamin E. Poly-unsaturated fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação das espécies reativas de oxigênio durante o metabolismo aeróbio 29
Figura 2 - Reação catalisada pela superóxido dismutase 33
Figura 3 - Reação catalisada pela catalase:.....34
Figura 4 - Reação catalisada pela GPx: 35
Figura 5 - Cadeia de formação das EROs e a destruição pelos seus respectivos antioxidantes enzimáticos 35
Figure 6 - Linear regression between thawed / dead sperm ratios with CASA and Microscope analysis of the number of sperm bound per mm^2 of EPM 58

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Relationship among thawed/dead sperm ratios and the following variables: number of spermatozoa bound to EPM evaluated by CASA (Esp/mm2 - CASA) and CM (Esp/mm2 - CM), plasma membrane integrity (intact), integrity acrosomal (acro), mitochondrial activity (DAB I, II, III and IV), total motility (MOTILE), progressive motility (PROG) and statics spermatozoa (STATIC)..... 57
Table 2 - Correlations among analysis of the number of sperm bound per mm^2 (CASA and CM) and values of plasma membrane integrity (IM), acrosomal integrity (IA) and mitochondrial activity (DAB I, II, III and IV)... 58
Table 3 - Correlations among analysis of the number of sperm bound per mm^2 (CASA and CM) and other sperm parameters assessed by CASA 58
Tabela 4 - Probabilidades para o efeito do Grupo (Controle, Vitamina E, PUFA e PUFA+VitaminaE), do tempo (0, 1, 45 e 60 dias) e da interação entre grupo e tempo na avaliação funcional e nas variáveis avaliadas pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).em sêmen criopreservado de touros Bos taurus submetidos à insulação escrotal – São Paulo – 2013 74
Tabela 5 - Efeito do tratamento com Vitamina E, da suplementação com PUFA e da combinação PUFA+Vitamina E sobre as avaliações funcionais do sêmen criopreservado de touros *Bos taurus* submetidos à insulação escrotal – São Paulo – 2013 76
Tabela 6 - Efeito do tratamento com Vitamina E, da suplementação com PUFA e da combinação PUFA+Vitamina E nas variáveis avaliadas pelo CASA em sêmen criopreservado de touros *Bos taurus* submetidos à insulação escrotal– São Paulo – 2013 77
Tabela 7 - Efeito do tempo (0, 1, 45 e 60 dias) sobre a avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros *Bos taurus* submetidos à insulação escrotal e tratados ou não com Vitamina E e PUFA – São Paulo – 2013 78
Tabela 8 - Efeito do tempo (0, 1, 45 e 60 dias) sobre as variáveis avaliadas pelo CASA em sêmen criopreservado de touros *Bos taurus* submetidos à insulação escrotal e tratados ou não com Vitamina E e PUFA – São Paulo – 2013 78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 REVISÃO DE LITERATURA 23

2.1 BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO EM BOVINOS 24

2.2 CRUZAMENTO INDUSTRIAL NA BOVINOCULTURA 25

2.3 ESTRESSE TÉRMICO E FERTILIDADE 26

2.3.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs) 28

2.3.1.1 Ânion superóxido 29

2.3.1.2 Peróxido de Hidrogênio 29

2.3.1.3 Radical Hidroxila 30

2.3.1.4 Óxido Nítrico (NO-) 30

2.3.2 EROs, estresse oxidativo e o espermatozóide 30

2.3.3 Sistemas de defesa antioxidante no sêmen 32

2.3.3.1 Antioxidantes enzimáticos 32

2.3.3.1.1 Superóxido Dismutase (SOD) 32

2.3.3.1.2 Catalase 33

2.3.3.1.3 Glutationa Peroxidase (GPx) / Glutationa Redutase(GRd) 34

2.3.3.2 Antioxidantes não enzimáticos 36

2.3.3.2.1 Vitamina E 36

2.3.4 Ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) x espermatozóide 37

2.4 AVALIAÇÕES DE SÊMEN 39

2.4.1 Testes convencionais 39

2.4.2 Testes funcionais 40

2.4.2.1 Integridade de membrana plasmática 40

2.4.2.2 Integridade acrossomal 41

2.4.2.3 Atividade mitocondrial 42

2.4.2.4 Integridade de DNA 42

2.4.2.5 Avaliação do estresse oxidativo 44

2.4.2.6 Testes de ligação espermática 44

3 HIPÓTESE 47

4 OBJETIVO 49

5 CAPITULO 1 - UTILIZATION OF SPERM-BINDING ASSAY COMBINED WITH COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS TO EVALUATE FROZEN-THAWED BULL SEMEN (Trabalho já no formato para envio à revista internacional) 51

5.1 INTRODUCTION 51

5.2 MATERIAL AND METHODS 53

5.2.1 Thawing and sperm processing 53

5.2.2 Egg Perivitelline Membrane (EPM) Processing and Sperm-egg Binding Assay 54

5.2.3 Computer assisted sperm analysis 55

5.2.4 Functional tests 55

5.2.5 Statistical Analysis 56

5.3 RESULTS 56

5.4 DISCUSSION 59

6 CAPITULO 2 - EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SISTÊMICO EM TOUROS BOS TAURUS TAURUS SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO E SUPLEMENTADOS COM DIETA RICA EM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS SOBRE A CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES À MEMBRANA VITELÍNICA DE OVOS DE GALINHA. 63

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS 63

6.1.1 Animais utilizados no experimento 63

6.1.2 Manejo e nutrição 63

6.1.3 Insulação escrotal 64

6.1.4 Tratamentos 64

6.1.5 Colheita do sêmen 65

6.1.6 Avaliações do sêmen 65

6.1.6.1 Testes convencionais para análise de sêmen 66

6.1.6.2 Análise computadorizada da motilidade (casa) 66

6.1.6.3 Testes funcionais para análise de sêmen 67

6.1.6.4 Integridade de membrana 68

6.1.6.4.1 Integridade acrossomal 68

6.1.6.4.2 Atividade mitocondrial 69
6.1.6.4.3 Integridade de DNA 69
6.1.7 Processamento e criopreservação do sêmen 70
6.1.8 Avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo 70
6.1.9 Teste de ligação espermática 71
6.1.9.1 Técnica de ligação espermática 72
6.1.9.2 Avaliação da ligação espermática 72
6.1.9.2.1 Avaliação da ligação espermática pelo CASA 72
6.1.9.2.2 Avaliação da ligação espermática pela microscopia convencional 73
6.1.10 Análise estatística 73
6.2 RESULTADOS 74
6.2.1 Efeito do Grupo 75
6.2.2 Efeito do Tempo 77
6.3 CORRELAÇÕES 79
6.4 DISCUSSÃO 82
7 CONCLUSÃO 90
REFERÊNCIAS 92

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura ocupa uma posição de destaque no setor agropecuário, chegando a um rebanho efetivo de 209,541 milhões de cabeças em 2010, com um aumento de 2,1% em relação ao ano de 2009, acompanhando o aumento das demandas interna e externa por proteína animal. Além disso, o Brasil é o líder mundial em exportações de carne bovina, é o segundo maior produtor mundial de carne bovina, ficando atrás somente dos Estados Unidos, e o sexto maior produtor mundial de leite de vaca (IBGE, 2010).

Pode-se dizer que as biotecnologias da reprodução têm contribuído nesse crescimento exponencial da bovinocultura no país, principalmente com o uso da inseminação artificial, excelente ferramenta que visa o aumento da produtividade e melhoramento genético em um determinado rebanho.

Apesar do aumento exponencial do emprego dessas biotecnologias, apenas 10% das fêmeas bovinas em idade reprodutiva são inseminadas (ASBIA, 2011). Sendo assim podemos concluir que a maioria dos produtores mantêm touros a campo para a utilização de monta natural.

Muitas propriedades tem procurado utilizar o cruzamento industrial que consiste no cruzamento entre touros *Bos taurus taurus* (taurino) *e* vacas *Bos taurus indicus* (zebuína). Esse tipo de cruzamento visa obter o máximo de heterose das proles (F1), obtendo assim, maior precocidade, maior ganho de peso, melhor acabamento de carcaça, melhor adaptabilidade ao clima tropical, melhor habilidade materna e maior resistência a endo e ectoparasitas (KOGER, 1980; ARTHUR; HEARNSHAW; STEPHENSON, 1999).

Visto que o cruzamento industrial composto por taurinos e zebuínos vem sendo utilizado em muitas propriedades no Brasil, e que a maioria desses cruzamentos ainda é realizada através da monta natural, há uma necessidade na manutenção de touros europeus (taurinos) a campo. No entanto, sua menor fertilidade causada pelo clima tropical pode causar um impacto negativo na reprodução, implicando na queda da produtividade do rebanho. Além disso, touros europeus confinados em centrais de criopreservação de sêmen também sofrem com o clima tropical de forma semelhante aos touros que estão a campo, podendo apresentar uma diminuição na qualidade espermática.

Touros *Bos taurus taurus* apresentam maior susceptibilidade ao estresse térmico que *Bos taurus indicus*, que provavelmente irá causar um estresse oxidativo em nível testicular e consequente comprometimento na qualidade espermática (NICHI et al., 2006a).

O estresse oxidativo é um desbalanço que ocorre entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante. As espécies reativas de oxigênio possuem um papel importante na fisiologia espermática e nos processos de fecundação. Porém, em um quadro de estresse oxidativo, as EROs irão causar danos as diferentes estruturas espermáticas como DNA, mitocôndria, membrana plasmática e acrossomo (DE LAMIRANDE et al., 1997).

O espermatozoide é uma célula particularmente susceptível ao estresse oxidativo pois possui um citoplasma extremamente reduzido e uma consequente redução na concentração de enzimas antioxidantes, em comparação a outros tipos celulares. Além disso, a membrana espermática é rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), que tornam os espermatozoides mais susceptíveis ao estresse oxidativo devido à presença de ligações duplas entre os carbonos, mais facilmente oxidados (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004b; NICHI et al., 2007). Desta forma, estudos vêm sendo realizados visando desenvolver uma forma de melhorar a qualidade espermática através da prevenção do estresse oxidativo (BILODEAU et al., 2001a; NICHI, 2009).

Estudos anteriores evidenciam que a suplementação com PUFA tanto na dieta quanto nas amostras de sêmen, tem melhorado a qualidade espermática, porém uma maior quantidade de PUFA no sêmen tornariam os espermatozoides ainda mais susceptíveis ao estresse oxidativo (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004a; BRINSKO et al., 2005; AITKEN, R. JOHN et al., 2006).

Portanto uma alternativa que parece ser plausível para melhorar a fertilidade de touros *Bos taurus taurus* criados em climas tropicais é a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados para melhorar a qualidade espermática associada a um tratamento antioxidante para prevenir o estresse oxidativo.

A vitamina E por promover um efeito protetor dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana espermática contra a peroxidação lipídica, e por agir quebrando a reação de formação das EROs, parece ser o antioxidante de eleição para associar a uma suplementação com PUFA (SIES, 1993; BRADFORD et al., 2003b).

No entanto, para avaliar o efeito destes tratamentos, é necessária uma avaliação criteriosa do sêmen. A análise prospectiva da relação entre fertilidade e os exames espermáticos convencionais demonstram que a probabilidade de fecundação está relacionada fatores como motilidade e vigor espermáticos, concentração espermática e alterações morfológicas do espermatozoide. No entanto, a limitação destes testes também tem sido reconhecida, principalmente em casos de infertilidade de razão desconhecida. Estudos anteriores indicam que testes funcionais, que visam avaliar a funcionalidade das diferentes estruturas espermáticas, pode ser uma alternativa importante para a avaliação da capacidade fecundante de uma determinada amostra seminal (AITKEN, 2006).

A avaliação da habilidade do espermatozoide de interagir com a zona pelúcida parece ser um teste funcional que pode predizer com bastante precisão esta capacidade fecundante, visto ser este o passo crucial para o processo de fecundação *in vivo*. Porém, a logística da utilização de oócitos para avaliar a qualidade espermática é bastante complicada (YANAGIMACHI, 1984; BURKMAN et al., 1988)

A membrana perivitelínica de aves apresenta uma homologia considerável com a proteína de zona pelúcida ZP3, e permite a ligação dos espermatozoides de diversas espécies mamíferas. Portanto o teste de ligação de espermatozoides à membrana vitelínica de ovos de galinha parece ser bastante eficiente para predizer a capacidade fecundante de uma determinada amostra espermática, além de ser um teste de custo acessível e relativamente fácil de ser realizado (BARBATO; CRAMER; HAMMERSTEDT, 1998; WACLAWEK, MARIANNE et al., 1998).

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A pecuária ocupa uma posição de destaque na economia brasileira. Segundo o IBGE em (IBGE, 2010), o setor agropecuário participou com 5,8% no Produto Interno Bruto (PIB) e movimentou um valor de R$ 180,831 bilhões, representando um crescimento de 6,5% sobre o volume registrado em 2009.

Nesse setor, a bovinocultura tem se destacado com um aumento de 2,1% em relação ao ano de 2009, acompanhando o aumento das demandas interna e externa por proteína animal. Além disso, o Brasil é o líder mundial em exportações e o segundo maior produtor mundial de carne bovina, ficando atrás somente dos Estados Unidos. Além disto, o Brasil se coloca em sexto no mundo em relação à produção de leite de vaca (IBGE, 2010).

O clima tropical e a extensão territorial do Brasil contribuem para esse resultado, uma vez que permitem a criação da maior parte do gado em pastagens. Além disso, o investimento em tecnologia e capacitação profissional; o desenvolvimento de políticas públicas, que permitam que o animal seja rastreado do seu nascimento até o abate; o controle da sanidade animal e segurança alimentar, contribuíram para que o País atendesse às exigências dos mercados rigorosos e conquistasse espaço no cenário mundial (MAPA, 2012).

O consumo brasileiro de carne bovina é relativamente alto, em média, 40 Kg de carne por ano, sendo um consumo maior em comparação à vários países desenvolvidos. Quanto às exportações de carne bovina, o Brasil lidera o ranking mundial. Um em cada quatro Kg de carne bovina comercializada internacionalmente sai do Brasil, garantindo cinco bilhões de dólares anuais à balança comercial. Além disso, a pecuária no Brasil emprega diretamente mais de sete milhões de brasileiros (BEEFPOINT, 2012).

2.1 BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO EM BOVINOS

Pode-se dizer que um dos motivos do aumento na produção de bovinos e a posição de destaque da bovinocultura no setor agropecuário brasileiro seria o emprego das biotecnologias da reprodução. Dentre essas biotecnologias estão a criopreservação e refrigeração do sêmen, a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE), a produção *in vitro* de embriões (PIV) e mais atualmente a clonagem e transgenia animal.

No entanto a IA ocupa uma posição de destaque, sendo a biotecnologia mais utilizada em todo o mundo. A IA possui diversas vantagens como facilitar o manejo reprodutivo, possibilitar a dispersão de material genético superior em um determinado rebanho, favorecer testes de progênie, implantar programas de controle zootécnico utilizando reprodutores de relevância produtiva, além de prevenir a disseminação de doenças venéreas (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

A história registra como marco inicial da inseminação artificial o ano de 1784, quando o monge italiano Lázaro Spallanzani demonstrou pela primeira vez ser possível a fecundação de uma fêmea sem o contato com o macho. Para tanto, ele coletou sêmen de um cachorro através da excitação mecânica e aplicou em uma cadela no cio, a qual veio a parir três filhotes 62 dias mais tarde. Era o nascimento de uma técnica que iria revolucionar o campo da reprodução animal (ASBIA, 2011).

No ano de 1949, Polge, Smith e Parker, demonstraram que os espermatozoides poderiam ser conservados por tempo indeterminado através da criopreservação. Até então o sêmen era conservado refrigerado à temperatura de 5ºC, possibilitando uma sobrevida máxima de 96 horas (ASBIA, 2011).

Esta descoberta permitiu uma maior difusão da inseminação artificial. Atualmente muitos países inseminam quase a totalidade de seus rebanhos bovinos. Calcula-se que mais de 106 milhões de fêmeas sejam anualmente inseminadas em todo o mundo (ASBIA, 2011).

A partir da década de 70, quando começaram a surgir empresas especializadas em inseminação artificial e criopreservação do sêmen, houve um crescimento exponencial do número de doses de sêmen bovino criopreservadas no Brasil, sendo que, em 2011 foram comercializadas 11.906.763 doses. Apesar dessa grande quantidade de doses comercializadas, e a difusão das biotecnologias da

reprodução no país há estimativas de que apenas 10% das fêmeas em idade reprodutiva sejam inseminadas (ASBIA, 2011). Portanto, pode-se concluir que a maioria dos produtores de bovinos do país mantêm touros a campo para a utilização de monta natural durante a estação reprodutiva .

Quando uma vaca possui um problema reprodutivo, há uma perda de 1 bezerro por ano. Porém, um touro com problema reprodutivo pode causar uma perda de 25 a 50 bezerros para cada 100 vacas (MOLINA et al., 2000). Sendo assim, é de grande importância a manutenção de touros a campo que possuam bons índices reprodutivos.

2.2 CRUZAMENTO INDUSTRIAL NA BOVINOCULTURA

O Brasil enfrenta um desafio de aumentar a demanda de carne bovina de qualidade por meio da eficiência dos sistemas de produção, e pelo atendimento aos princípios de sustentabilidade ambiental. Infelizmente não existe uma raça que atenda todas as necessidades dos sistemas de produção, sendo necessário o uso de algumas ferramentas para aumentar a produtividade como as biotecnologias da reprodução, o melhoramento genético e o cruzamento entre raças.

O método convencional usado para promover o melhoramento genético em um rebanho é a seleção dos animais geneticamente superiores. Porém, além de ser uma técnica de progresso muito lento, não é possível incorporar genes desejáveis nos descendentes que não são característicos de sua raça (RESTLE et al., 2002).

Willham (1970) demonstrou que por meio de cruzamentos entre raças diferentes é possível incorporar genes de forma mais rápida e mais eficiente do que no melhoramento genético convencional. Esse tipo de cruzamento é denominado cruzamento industrial ou cruzamento terminal.

O cruzamento industrial visa obter o máximo de heterose das proles, conferindo aos descendentes uma soma de características genéticas desejáveis provenientes das raças envolvidas neste cruzamento (ARTHUR; HEARNSHAW; STEPHENSON, 1999)

A heterose é um fenômeno genético que expressa a superioridade de

indivíduos cruzados (F1) em relação à média do desempenho dos seus pais. Segundo Roso e Fries (2000), o cruzamento entre *Bos taurus* (taurinos) e *Bos indicus* (zebuínos) resultam em uma maior heterose do que o cruzamento somente entre *Bos taurus*.

O fato de que bovinos taurinos possuem maior precocidade sexual, maior ganho de peso, melhor acabamento de carcaça, maior produção de leite e que zebuínos possuem maior adaptabilidade ao clima tropical, maior resistência a endo e ectoparasitas e maior habilidade materna, tornam o cruzamento entre eles extremamente desejável, já que seus descendentes irão incorporar as características de ambos obtendo o máximo de heterose (KOGER, 1980; ARTHUR; HEARNSHAW; STEPHENSON, 1999).

Visto que o cruzamento industrial composto por taurinos e zebuínos é utilizado de forma intensa no Brasil, há uma necessidade de se manter touros europeus (taurinos) a campo para a utilização da monta natural ou em centrais de criopreservação de sêmen. No entanto, sua menor fertilidade em relação aos zebuínos quando criados em regiões de clima tropical, pode causar um impacto negativo na reprodução, implicando na queda da produtividade do rebanho.

2.3 ESTRESSE TÉRMICO E FERTILIDADE

Sabe-se que touros europeus são mais susceptíveis ao estresse térmico quando comparados aos touros zebuínos, que são adaptados a clima tropicais (CARTWRIGHT, 1955). Os Touros zebuínos possuem uma pele mais extensa e uma maior quantidade de glândulas sudoríparas, além de possuírem uma termogênese menor que os taurinos, e por terem uma melhor termorregulação se tornam mais resistentes ao estresse térmico (TURNER, 1980).

Cartwright (1955) submeteu taurinos e zebuínos a altas temperaturas em câmaras climáticas e verificou que zebuínos apresentaram um melhor desempenho em relação às condições fisiológicas como temperatura corporal e frequências cardíaca e respiratória.

Diversos trabalhos demonstram a influência do estresse térmico nos parâmetros reprodutivos de taurinos e zebuínos. Segundo Skinner e Louw (1966), touros *Bos indicus* expostos a altas temperaturas, apresentaram uma queda mais lenta e menos acentuada na qualidade espermática, e uma recuperação mais rápida, em comparação aos *Bos taurus* e mestiços.

Fields et al. (1979), observaram que touros europeus não adaptados a climas tropicais apresentam uma redução na motilidade, concentração e volume espermático no verão quando comparado a touros zebuínos ou europeus adaptados.

Nichi et al. (2006a), verificaram que amostras seminais de touros simentais criados no estado do Mato Grosso do Sul apresentaram um maior número de defeitos espermáticos maiores e totais assim como uma maior peroxidação lipídica no verão em relação ao inverno.

Uma das causas da diminuição da qualidade espermática em touros europeus expostos ao estresse térmico seria um quadro de degeneração testicular que afeta diversos parâmetros espermáticos como a morfologia espermática (devido a alterações na espermatogênese), motilidade, vigor e concentração (PARKINSON, 1987; BARTH; BOWMAN, 1994).

Os testículos da maioria dos mamíferos se localizam no escroto, fora da cavidade abdominal, permanecendo de 2 a 8°C abaixo da temperatura corporal. A temperatura testicular é regulada por um mecanismo de contra corrente entre o plexo pampiniforme e a artéria testicular. Além disso, glândulas sudoríparas presentes no escroto, o músculo cremaster e túnica dartos contribuem para que os testículos permaneçam abaixo da temperatura corpórea. Qualquer interrupção desses mecanismos podem causar problemas na espermatogênese (PAUL; TENG; SAUNDERS, 2009).

Sabe-se que esse mecanismo de termorregulação do testículo é pouco eficiente. Acredita-se que apenas 50% do aporte sanguíneo que chega através da artéria testicular irrigam os testículos, fazendo com que as gônadas masculinas trabalhem a beira da hipóxia (GABALDI; WOLF, 2002).

O aumento do metabolismo no testículo após um estresse térmico não é compensado por um aumento do fluxo sanguíneo, fazendo com que o testículo entre em um quadro de hipóxia (PAUL; TENG; SAUNDERS, 2009).

Após uma amenização do quadro de estresse térmico, a hipóxia é interrompida e a vascularização testicular retorna ao normal. Com o reinício da oxigenação, há um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio causando um estresse oxidativo testicular. Esse mecanismo é conhecido como síndrome da isquemia-reperfusão (NICHI et al., 2006b; REYES et al., 2012).

Portanto uma possível explicação da diminuição na fertilidade de touros europeus não adaptados quando criados em climas tropicais é que o estresse térmico irá levar a um estresse oxidativo testicular pelo mecanismo de isquemia-reperfusão causando um comprometimento na qualidade espermática (NICHI et al., 2006b)

2.3.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Há milhões de anos atrás, organismos menos complexos como alguns tipos de algas e organismos unicelulares utilizavam o gás carbônico, que,assim como outros gases, era encontrado em grande quantidade no ambiente terrestre, como fonte de energia. Como resultado deste metabolismo era produzido o oxigênio, que era um metabólito considerado tóxico e encontrado em poucas quantidades no ambiente terrestre (HOCHACHKA; LUTZ, 2001; REYES et al., 2012).

Ao longo dos anos, com o surgimento de organismos mais complexos, houve uma maior disponibilidade de oxigênio na atmosfera e esses organismos passaram a utilizar o metabolismo aeróbio como sua principal fonte de energia (WAYNE, 1985).

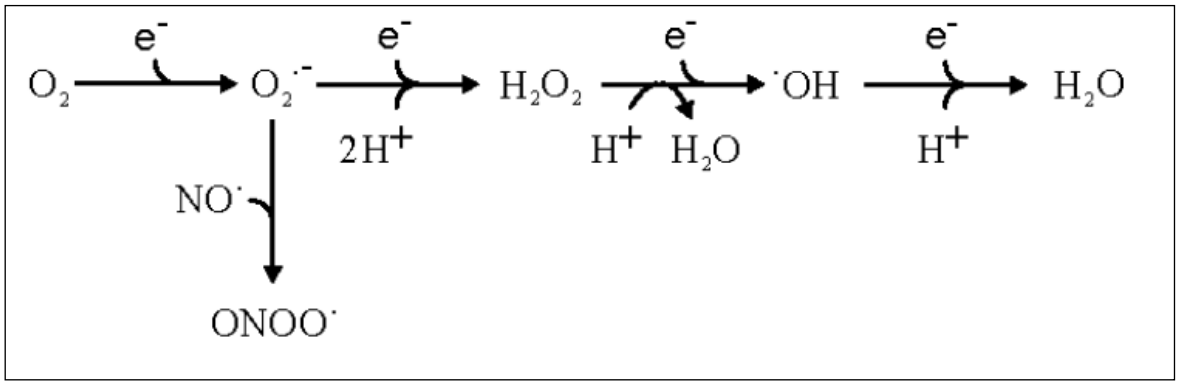
Esses organismos, a partir deste momento, passaram a ser submetidos ao chamado “Paradoxo do Oxigênio”; apesar do oxigênio ser essencial para que haja vida, o seu consumo produz metabólitos que são potencialmente prejudiciais aos sistemas biológicos.

Esses metabólitos produzidos a partir do consumo de oxigênio são chamados de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Algumas dessas EROs podem ser chamadas de Radicais Livres por possuírem elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Durante o metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2), sofre uma

redução tetravalente resultando na formação de H_2O. Durante esse processo são formados intermediários reativos (EROs) como: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-) e óxido nítrico (NO_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 1999). A cadeia de formação das espécies reativas de oxigênio está representada na figura 1.

Figura 1 - Formação das espécies reativas de oxigênio durante o metabolismo aeróbio



Fonte: Nichi et al. (2003)

2.3.1.1 Ânion superóxido

O ânion superóxido (O_2^-) pode ser considerado o produto primário deste sistema produtor de EROs, pois é um radical livre formado espontaneamente na membrana mitocondrial, rica em elétrons, a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Apesar de ser um radical livre, o O_2^- é pouco reativo, já que não possui capacidade para penetrar em membranas biológicas, agindo apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG.; ARNER, 2001).

2.3.1.2 Peróxido de Hidrogênio

O H_2O_2 é formado a partir de uma dismutação do O_2^- por um antioxidante

enzimático conhecido como ânion superóxido (SOD). O peróxido de hidrogênio, apesar de não ser um radical livre, é extremamente deletério devido à meia-vida relativamente longa e à sua capacidade de penetrar membranas biológicas podendo causar danos em outros compartimentos além do qual foi produzido além de ser uma substância intermediária na formação do radical hidroxila (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

2.3.1.3 Radical Hidroxila

O radical hidroxila (OH^-) é considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos, possuindo alta capacidade de causar danos às estruturas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Este radical é formado a partir do peróxido de hidrogênio, sendo que a reação entre uma molécula de H_2O_2 e uma molécula de Fe^{2+} ou Cu^+ (geralmente ligados à proteínas como a ferritina) originará o radical hidroxila. Esta reação é conhecida como Reação de Fenton (HALLIWELL, 1999).

2.3.1.4 Óxido Nítrico (NO-)

O oxido nítrico, apesar de possuir um elétron despareado, é considerado um radical livre pouco reativo, assim como o ânion superóxido. O NO^- reage com outros radicais livres facilmente, gerando radicais menos reativos, agindo portanto como um antioxidante. Porém se o NO^- for produzido em grandes quantidades paralelamente ao O_2^- , ambos reagem e formam o peróxidonitrito ($OONO^-$) que possui uma alta citotoxidade (NICHI, 2003).

2.3.2 EROs, estresse oxidativo e o espermatozóide

As espécies reativas de oxigênio desempenham um papel importante na fisiologia espermática, sendo necessárias para que ocorram os processos de fertilização como a hiperativação espermática, capacitação espermática, indução da

reação acrossomal, ligação entre espermatozoide e oócito e penetração através da zona pelúcida (DE LAMIRANDE et al., 1997).

Apesar das EROs exercerem um papel fisiológico , é necessário que haja um equilíbrio entre a quantidade de EROs gerada e a capacidade antioxidante de uma determinada amostra espermática. Quando há um desequilíbrio desse sistema, ocorre o chamado estresse oxidativo. Esse estresse pode ocorrer tanto pelo excesso de EROs gerada quanto pela diminuição da capacidade antioxidante que não consegue eliminar de forma eficiente as espécies reativas de oxigênio produzidas O estresse oxidativo causará danos às diferentes estruturas espermáticas como o acrossoma, membrana plasmática, DNA e mitocôndria (HALLIWELL, 1999).

A produção de EROs pelo espermatozoide ocorre fisiologicamente, porém estudos indicam que uma maior quantidade de EROs é produzida por espermatozoides imóveis, funcionalmente anormais e morfologicamente anormais (GOMEZ et al., 1998; ENGEL et al., 1999).

Os principais defeitos espermáticos relacionado à produção de EROs são as gotas citoplasmáticas proximal e distal. Visto que estes espermatozoides possuem a presença de um citoplasma residual, provavelmente ocorreria um aumento na capacidade destas células de produzirem NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) que serve como doadora de elétrons na produção de EROs (GOMEZ; IRVINE; AITKEN, 1998; OLLERO et al., 2001).

Segundo Nichi et al. (2007), as gotas citoplasmáticas proximais de espermatozóides colhidos de epidídimo bovino tiveram uma correlação positiva com estresse oxidativo. Já nas gotas citoplasmáticas distais foi encontrada uma correlação negativa com estresse oxidativo, sugerindo que as gotas distais possuem uma função de proteção antioxidante no epidídimo.

Outra fonte de produção de EROs no sêmen seria em casos de leucocitospermia. Segundo Aitken, West e Buckingham (1994) em amostras de sêmen contaminadas por leucócitos, altos níveis de EROs foram detectados, que inibiram a fusão entre espermatozoide e oócito.

Sabe-se que o processo de criopreservação do sêmen também induz a produção de EROs (WATSON, 2000). Segundo Bilodeu et al. (2000) o processo de congelação e descongelação do sêmen promovem um decréscimo nos níveis de antioxidante, levando a um quadro de estresse oxidativo no sêmen. Por esse motivo diversos estudos vêm sendo realizados com a adição de antioxidantes no meio para

criopreservação do sêmen (O'FLAHERTY; BECONI; BEORLEGUI, 1997; BILODEAU et al., 2001; NICHI, 2009)

O espermatozoide é uma célula particularmente susceptível ao estresse oxidativo por possuir um citoplasma extremamente reduzido, com consequente concentração limitada de enzimas antioxidantes. Além disso, a membrana espermática é rica em ácidos graxos poli-insaturados,que tornam os espermatozoides mais susceptíveis ao estresse oxidativo (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004; NICHI et al., 2007).

2.3.3 Sistemas de defesa antioxidante no sêmen

Apesar reduzida eficiência dos espermatozoides na produção de antioxidantes devido ao seu citoplasma extremamente reduzido, o plasma seminal compensa essa deficiência por conter uma série de antioxidantes tanto enzimáticos quanto não enzimáticos (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999; VERNET; AITKEN; DREVET, 2004).

2.3.3.1 Antioxidantes enzimáticos

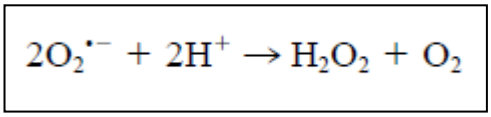
O plasma seminal possui um sistema enzimático de antioxidantes que inclui a superóxido dismutase (ALVAREZ et al., 1987), catalase (JEULIN et al., 1989) e o sistema glutationa peroxidase/glutationa redutase (CHAUDIERE; WILHELMSEN; TAPPEL, 1984).

2.3.3.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A superóxido dismutase (SOD) foi a primeira enzima antioxidante a ser identificada (ALVAREZ et al., 1987). A SOD é considerada uma linha primária de defesa antioxidante agindo através da dismutação de duas moléculas de ânion superóxido (O_2^-) formando uma molécula de oxigênio e uma molécula de peróxido

de hidrogênio (H_2O_2) (NORDBERG; ARNER, 2001). A reação catalisada pela enzima superóxido dismutase está representada na figura 2.

Figura 2 - Reação catalisada pela superóxido dismutase



Fonte: Nordberg e Arnér (2001)

A SOD pode ser dividida em 3 grupos: a Mn-SOD que é manganês dependente e está localizada na mitocôndria espermática, a Cu/Zn-SOD que é dependente de cobre e zinco e está localizada no citosol e a SOD extracelular presente em tecidos e fluídos extracelulares (MATES, 2000).

A atividade da SOD já foi identificada no espermatozoide e/ou plasma de diversas espécies como bovinos (BILODEAU et al., 2000), humanos (AITKEN, R. J. et al., 1996; ZINI; GARRELS; PHANG, 2000) e ratos (JOW et al., 1993).

Segundo Bilodeau et al. (2000) foi detectada uma alta atividade de SOD no espermatozoide e no plasma seminal bovino. Segundo Alvarez et al. (1987) a SOD é o principal mecanismo de defesa contra a peroxidação lipídica do sêmen humano.

2.3.3.1.2 Catalase

A catalase é uma hemeproteína presente no citoplasma das células, e catalisa uma reação, na qual duas moléculas de H_2O_2 são convertidas em duas moléculas de água e uma de oxigênio (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Essa reação esta representada na figura 3.

Figura 3 - Reação catalisada pela catalase:

$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

Fonte: Nordberg e Arnér (2001)

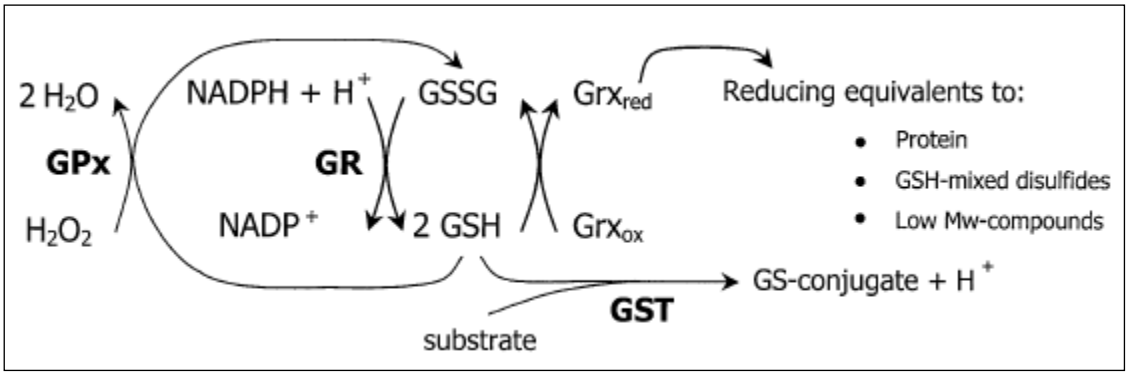
Segundo Bilodeau et al. (2000), no espermatozoide bovino nenhuma atividade de catalase foi detectada e no plasma seminal foi detectada uma baixa atividade desta mesma enzima.

2.3.3.1.3 Glutationa Peroxidase (GPx) / Glutationa Redutase(GRd)

A glutationa peroxidase (GPx) é uma enzima antioxidante que pode ser dividida em GPx selênio-dependentes e GPx selênio independentes, sendo que as GPx selênio dependentes são capases de decompor H_2O_2 e hidro/lipoperóxidos (HALLIWELL, 1999).

A GPx catalisa uma reação, na qual a glutationa reduzida (GSH) é usada como substrato para decompor o H_2O_2 , resultando em H_2O e glutationa oxidada (GSSG). A glutationa reduzida (GRd) reduz a GSSG em GSH que pode ser utilizada novamente no sistema. A GRd é uma flavoproteína dependente de NADPH e, portanto, depende da integridade da via das pentoses. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 1999). A reação catalisada pela glutationa peroxidase está representada na figura 4.

Figura 4 - Reação catalisada pela GPx:

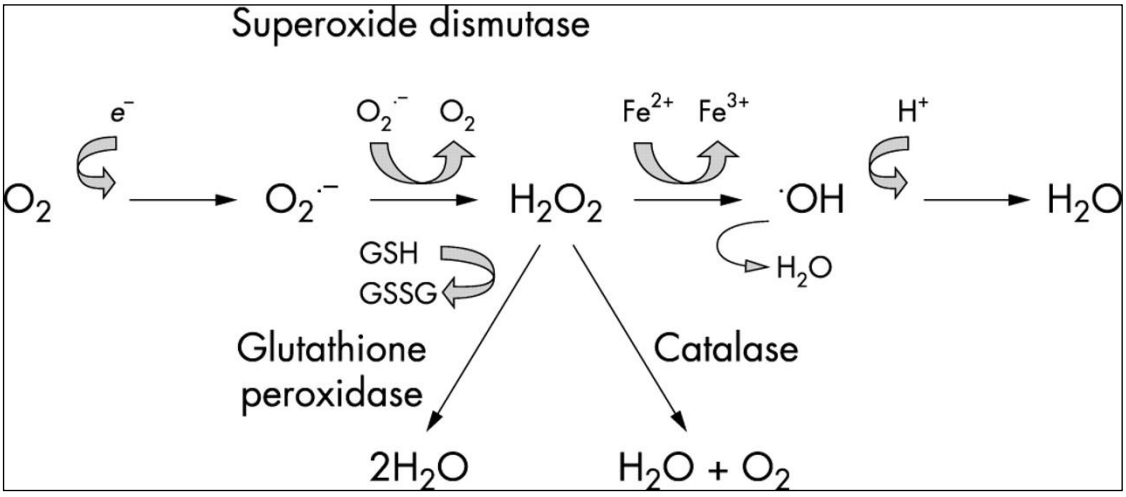


Fonte: Nordberg e Arnér (2001)

Alguns trabalhos indentificaram uma alta atividade de GPx no sêmen bovino (BILODEAU et al., 2000; NICHI et al., 2006a)

A cadeia de formação das EROs e a destruição pelos seus respectivos antioxidantes enzimáticos está ilustrada na figura 5.

Figura 5 - Cadeia de formação das EROs e a destruição pelos seus respectivos antioxidantes enzimáticos



Fonte: Neldeljkivic, Gokce e Loscalzo (2003)

2.3.3.2 Antioxidantes não enzimáticos

Além dos antioxidantes enzimáticos, o plasma seminal contêm diversos antioxidantes não enzimáticos como o ácido ascórbico (vitamina C), α-tocoferol (vitamina E), glutationa, piruvato, urato, taurina e hipotaurina (JÓŹWIK et al., 1997; ZINI; GARRELS; PHANG, 2000). Dentre os antioxidantes envolvidos na reprodução, merecem destaque a vitamina C e a vitamina E (ANDRADE et al., 2010).

O ácido ascórbico é um antioxidante hidrossolúvel de grande importância, pois, além de participar da regeneração da vitamina E, atua destruindo os radicais livres, sendo considerado um agente redutor devido a sua capacidade de doar H^+ (FRAGA et al., 1991).

Além disso, ele atua protegendo o citocromo P-450, enzima que participa da transferência de elétrons no metabolismo aeróbico espermático (FRAGA et al., 1991). Em concordância com esse fato, Nichi (2009) verificou que a adição de ácido ascórbico no meio de criopreservação de espermatozoides bovinos colhidos do epidídimo, promoveu um efeito protetor em relação à atividade mitocondrial.

Segundo Fraga et al. (1991), uma suplementação com vitamina C promoveu efeito protetor contra danos oxidativos do DNA espermático humano, sendo uma das principais causas de infertilidade idiopática na reprodução humana.

2.3.3.2.1 Vitamina E

O termo vitamina E foi descrito pela primeira vez por Evans e Bishop (1922) como um fator nutricional importante para as funções reprodutivas (HATAMOTO, 2004)

A vitamina E é a designação genérica de todos os derivados de tocoferol e tocotrienol, que possuem 4 isoformas descritas como α, β, γ e δ, constituíndo 8 compostos químicos diferentes. Entretanto o α-tocoferol apresenta uma maior atividade metabólica e biológica no organismo (HATAMOTO, 2004).

O α-tocoferol é um antioxidante lipossolúvel presente em membranas biológica (MATES, 2000). Este antioxidante age pela interceptação das EROs,

quebrando a reação de formação dos radicais livres resultando em produtos não radicais, ou seja, sem elétrons despareados na última camada eletrônica (SIES, 1993).

Assim como os outros antioxidantes, há controvérsias em relação ao efeito do tratamento com vitamina E, tanto de amostras espermáticas quanto dos próprios animais. Provavelmente, os diferentes resultados (benéficos ou deletérios) obtidos ocorrem, devido as diferentes concentrações de antioxidantes usadas nos diferentes experimentos. Assim como já foi dito anteriormente, as EROs possuem um papel importante na fisiologia espermática e nos processos de fertilização. Portanto, um excesso de antioxidantes provavelmente irá inibir esse efeito fisiológico das EROs (DE LAMIRANDE et al., 1997).

Segundo Nichi (2009), o tratamento de amostras espermáticas epididimárias de bovinos com vitamina E nas concentrações de 0,5 e 1,5 mM promoveram um efeito deletério na motilidade. Por outro lado, em um trabalho realizado por Beconi et al. (1991) sugeriu que o tratamento com vitamina E promoveu um efeito positivo na motilidade espermática de bovinos.

Em trabalho realizado por Barnabe et al. (2012), touros *Bos taurus* submetidos ao estresse térmico testicular, apresentaram uma maior motilidade espermática e uma diminuição da susceptibilidade ao estresse oxidativo quando tratados com vitamina E injetável em relação aos animais controle.

Sabe-se que a vitamina E protege os ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana contra a peroxidação lipídica (BRADFORD et al., 2003a). Diversos trabalhos vêm demonstrando que o tratamento tanto de animais quanto de amostras espermáticas com vitamina E, exerce efeito protetor contra a peroxidação lipídica causada pelas EROs (BREININGER et al., 2005; HATAMOTO et al., 2006; BARNABE et al., 2012).

2.3.4 Ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) x espermatozóide

A membrana plasmática do espermatozoide possui uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA). Estes, por possuírem duplas ligações entre as moléculas de carbono, conferem certa fluidez ao espermatozoide, sendo

essencial para os processos fisiológicos como a motilidade espermática e nos processos de fertilização (LEAT et al., 1983; LANGLAIS; ROBERTS, 1985; LADHA, 1998).

Estudos indicam que a composição lipídica da membrana espermática de diversas espécies também influencia a resistência ao choque pelo frio, sendo importantes para a biotecnologia do sêmen, nos processos de refrigeração e criopreservação (PARKS; LYNCH, 1992).

Apesar do efeito benéfico das PUFAs ao espermatozoide, esta alta quantidade os faz altamente susceptíveis ao ataque das EROs, visto que às ligações entre carbono e hidrogênio adjacentes as ligações duplas (insaturações) são mais facilmente clivadas pelas EROs (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004). Além disso, a oxidação dos lipídios da membrana espermática, denominada peroxidação lipídica, formam produtos extremamente citotóxicos, sendo que o principal produto da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA). (AITKEN.; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993a).

Segundo Losano et al. (2012), o MDA foi mais lesivo para a atividade mitocondrial e integridade de DNA de espermatozoides bovino do que as próprias EROs, quando estes animais foram tratados com PUFAS e submetidos ao estresse térmico.

A suplementação da dieta com PUFAs em machos tem sido estudada em diversas espécies com diferentes resultados, tanto negativos (AITKEN, et al., 2006) como positivos (BRINSKO et al., 2005). No entanto, poucos estudos relacionam o tratamento com PUFAs e um possível efeito em relação à susceptibilidade ao ataque das ROS.

Um tratamento com PUFA que alterasse o perfil lipídico seminal ou espermático poderia causar enorme impacto para estes animais. Caso os PUFAs fossem incorporados à membrana espermática, isto os tornaria mais susceptíveis ao ataque das ROS. Esse efeito poderia ser exacerbado se esses animais tratados com PUFA estiverem em estresse térmico, pois tornariam as células espermáticas ainda mais susceptíveis ao estresse oxidativo. Caso os PUFAs apenas se incorporem ao plasma seminal, haveria uma maior quantidade de substrato para o ataque das ROS, o que pouparia as células espermáticas do ataque das EROs (NICHI,2009).

Portanto, uma alternativa que parece ser plausível para melhorar a fertilidade de touros *Bos taurus taurus* submetidos ao estresse térmico , seria a suplementação

com ácidos graxos poli-insaturados para melhorar a qualidade espermática associada a um tratamento antioxidante para prevenir o estresse oxidativo, já que esses ácidos graxos tornam os espermatozoides mais susceptíveis a este estresse.

Já que a vitamina E promove um efeito protetor dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana espermática contra a peroxidação lipídica, este parece ser o antioxidante de eleição para associar a uma suplementação com PUFA. No entanto uma avaliação criteriosa do sêmen utilizando testes convencionais e funcionais se torna necessária para avaliar o efeito destes tratamentos.

2.4 AVALIAÇÕES DE SÊMEN

Existem diversos testes laboratoriais disponíveis que são considerados de grande importância para predizer a capacidade fecundante do sêmen. Porém, nenhum destes testes, isoladamente, é capaz de predizer a fertilidade de uma determinada amostra espermática, sendo necessária uma associação dessas avaliações. Os testes utilizados para a avaliação de sêmen podem ser divididos em testes convencionais e testes funcionais (GRAHAM; KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990; AITKEN, 2006).

2.4.1 Testes convencionais

Os testes convencionais de análise de sêmen são aqueles realizados rotineiramente em um espermograma. Estes podem ser divididos em características físicas e morfológicas do sêmen. As características físicas são: volume, coloração, aspecto, pH, concentração espermática, turbilhonamento, motilidade e vigor espermático. As características morfológicas estão relacionadas à porcentagem de células morfologicamente normais e a porcentagem de defeitos espermáticos totais e individuais presentes em uma determinada amostra espermática.

Diversos pesquisadores que estudam a relação entre fertilidade e os exames espermáticos convencionais demonstram que a probabilidade de fecundação está

relacionada à fatores como motilidade e vigor espermáticos, concentração espermática e alterações morfológicas do espermatozóide. No entanto, a limitação destes testes também tem sido reconhecida, principalmente em casos de infertilidade de razão desconhecida. Claramente, nestes casos, o exame convencional do sêmen não conseguiu detectar deficiências funcionais das estruturas espermáticas responsáveis pela infertilidade. Assim, para refinar a predição da fertilidade de uma determinada amostra, testes funcionais têm sido desenvolvidos (AITKEN, R. J., 2006)

2.4.2 Testes funcionais

Os testes funcionais são aqueles capazes de avaliar a função das diferentes estruturas espermáticas isoladamente como membrana plasmática, acrossoma, mitocôndrias e DNA, sendo de extrema importância para refinar a predição da fertilidade de uma amostra seminal e detectar uma possível causa do que se chama de “infertilidade sem causa aparente” (AITKEN, R. J., 2006)

2.4.2.1 Integridade de membrana plasmática

A membrana plasmática é responsável pelo equilíbrio osmótico da célula agindo como barreira entre o meio intra e extracelular, sendo que lesões e alterações de permeabilidade da membrana podem alterar a homeostase e levar a morte celular (AMANN, R.; PICKETT, 1987).

Diversos testes estão disponíveis para avaliar a integridade de membrana plasmática, tanto testes que utilizam sondas fluorescentes como o iodeto de propídio (PI), SYBR-14, Hoechst 33258 (H258) e 33342 (H342), diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e a Concanavalina A (ConA) associada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC), quanto os que utilizam corantes convencionais como a Eosina-Nigrosina (BARTH, A.; OKO, 1989; DE ARRUDA et al., 2005)

Uma sonda fluorescente comumente utilizada para avaliar a integridade de membrana é o iodeto de propídeo. Este corante consegue penetrar em apenas membranas lesionadas ou com alterações de permeabilidade e neste caso, devido à especificidade desta sonda pelo DNA, espermatozoides com membranas lesionadas irão ter o núcleo corado de vermelho (PETERSON; SILVERSTEIN; FREUND, 1974).

Já um corante convencional bastante utilizado para fazer essa avaliação é a Eosina-Nigrosina. Células com lesões ou alterações de permeabilidade permitem que a eosina entre na célula e a core de rosa. Por outro lado, em espermatozoides íntegros, o corante não consegue penetrar, sendo que o espermatozoide, contrastando com a coloração escura da nigrosina, são visualizados na cor branca (BARTH, A.; OKO, 1989).

2.4.2.2 Integridade acrossomal

O acrossoma é essencial para que ocorra a ligação entre o espermatozoide e o oócito, sendo que na reação acrossômica ocorre a liberação de enzimas hidrolíticas como a acrosina e hialuronidase que agem em conjunto permitindo a penetração do espermatozoide através da zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática com o oócito (HAFEZ; HAFEZ,2004).

Sendo assim, a integridade do acrossoma é crucial para que ocorram os processos de fertilização. Para a avaliação da integridade acrossômica por sondas fluorescentes tem-se utilizado algumas aglutininas como aglutinina de Ricinus communis (RCA), aglutinina de Pisum sativum (PSA), aglutinina de Arachis hypogea (PNA) e Concanavalia ensiformis (ConA) (DE ARRUDA et al., 2005).

A coloração Simples Fast-Green/Rosa-Bengala (coloração de Pope) é uma técnica bastante eficiente para avaliar a integridade acrossomal podendo ser utilizada a campo. Além disto, é uma técnica de fácil utilização e com custo acessível. Nesta coloração, o acrossoma íntegro é corado de roxo, ficando mais escuro que a região pós-acrossomal enquanto o acrossoma lesionado fica com uma coloração rósea, mais clara que a região pós acrossomal (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991).

2.4.2.3 Atividade mitocondrial

As mitocôndrias espermáticas vêm sendo muito estudadas nessas últimas décadas. Estas estão dispostas helicoidalmente na peça intermediária do espermatozoide e são responsáveis por aproximadamente 90% da energia celular através da fosforilação oxidativa. Estas organelas são responsáveis pela maior parte da produção endógenas de espécies reativas de oxigênio, além de serem consideradas as reguladoras centrais da apoptose celular (RIBEIRO; PESSOA).

Os principais testes utilizados para avaliar a atividade mitocondrial são as sondas fluorescentes Rodamina 123 (R123), MitoTracker Green FM (MITO), MitoTracker red ou CMXRos e JC-1 (iodeto de 5,5',6,6' – tetracloro - 1,1,3,3' – tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), além da técnica citoquímica da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (RONOT et al., 1986; HRUDKA, 1987; GRAVANCE, C. G. et al., 2000).

No teste DAB, a diaminobenzidina, ao entrar em contato com o citocromo-c, (enzima que desempenha um papel importante no metabolismo aeróbio das mitocôndrias), é oxidada formando um complexo de coloração marrom que se deposita em mitocôndrias ativas (HRUDKA, 1987).

O teste DAB parece ser uma excelente técnica para avaliar a atividade mitocondrial, já que é possível dividir essa atividade em classes de acordo com a porcentagem de mitocôndrias coradas de marrom, portanto ativas, sendo comumente dividida em 4 classes: alta, média, baixa e ausência de atividade mitocondrial (HRUDKA, 1987).

2.4.2.4 Integridade de DNA

Para que o espermatozoide fecunde o oócito dando origem a um indivíduo, é de extrema importância que todas as estruturas espermáticas estejam intactas. Porém, o DNA é de importância fundamental, já que uma das principais funções do espermatozoide é levar um DNA paterno intacto até o oócito para uni-lo ao DNA

materno dando origem a um embrião (EVENSON, D. P. et al., 1999; SAKKAS; ALVAREZ, 2010).

Portanto, para que essa estrutura esteja devidamente protegida, na espermiogênese, ocorre a troca de histonas por protaminas, evento conhecido com protaminação, que deixam o DNA espermático extremamente compacto, protegendo-o contra agressões (SAKKAS; ALVAREZ, 2010).

Apesar desta compactação, existem alguns mecanismos que levam à fragmentação do DNA espermático como: a falha na apoptose durante a espermatogênese, quebras de DNA durante o remodelamento da cromatina (espermiogênese), quebras causada por espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo), fragmentação causada por caspases endógenas e endonucleases, danos de DNA causados por radioterapia e quimioterapia assim como danos causados por tóxicos ambientais (SAKKAS; ALVAREZ, 2010).

Quando o espertmatozóide possui uma baixa fragmentação de DNA, o oócito assim como o embrião possuem mecanismos para corrigir essa fragmentação, dando origem a um indivíduo normal (WYROBEK et al., 2006; GASCA et al., 2007).

Já, em casos de alta fragmentação, estes mecanismos parecem não ser capazes de realizar tal correção, acarretando em morte embrionária, aborto ou ainda doenças congênitas e problemas em gerações futuras (TESARIK; GRECO; MENDOZA, 2004; MARCHETTI; WYROBEK, 2005).

A fragmentação de DNA está muito relacionada à infertilidade sem causa aparente, já que espermatozoides com DNA fragmentado podem apresentar valores normais de motilidade e morfologia e portanto, serem incapazes de gerar um embrião e um descendente com problemas (BURRELLO et al., 2004). Por isso o ideal seria utilizar um teste funcional para avaliar a integridade do DNA espermático em combinação com o espermograma.

Existem diferentes testes que avaliam a integridade de DNA espermático como o Ensaio Cometa (HUGHES et al., 1996), Ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA) (EVENSON, D.; WIXON, 2006), TdT-mediated-dUTP nick-end labeling (Ensaio TUNEL) (GORCZYCA; GONG; DARZYNKIEWICZ, 1993), Cromomicina A3 (MANICARDI et al., 1995) e Teste de dispersão da cromatina espermática (FERNANDEZ et al., 2003).

2.4.2.5 Avaliação do estresse oxidativo

A avaliação do estresse oxidativo de uma amostra espermática parece ser válida, principalmente quando se procura uma possível causa de infertilidade ou quando há uma suspeita de estresse oxidativo testicular.

Um teste bastante utilizado para avaliar o estresse oxidativo é a avaliação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Neste teste é adicionado o ácido tiobarbitúrico que ao reagir com o malondialdeído, produto da peroxidação lipídica, forma um complexo de coloração rósea que é quantificado em espectrofotômetro. Portanto o TBARS avalia o estresse oxidativo indiretamente através da mensuração da peroxidação lipídica (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

Outro teste utilizado para avaliar o estresse oxidativo é a sonda fluorescente C11-BODIPY (4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4- bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid). O BODIPY é um análogo de ácidos graxos poli-insaturados que possuem a capacidade de se incorporar na membrana celular. Quando este análogo está intacto fluoresce em vermelho, quando a sonda é oxidada pelas EROs há uma mudança para a cor verde (AITKEN et al., 2007).

2.4.2.6 Testes de ligação espermática

Apesar dos testes funcionais representarem uma ferramenta de grande importância para a avaliação da capacidade fecundante de uma determinada amostra seminal, a avaliação da habilidade do espermatozóide de interagir com a zona pelúcida parece ser um teste que pode predizer com bastante precisão esta capacidade, visto ser este o passo crucial para o processo de fecundação *in vivo* (BURKMAN et al., 1988)

A interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida ocorre através da ligação do espermatozoide com as proteínas da zona pelúcida 3 e 2 (ZP3 e ZP2).

Essa interação pode ser avaliada pelo teste da hemizona (BURKMAN et al., 1988). No entanto, dependendo da espécie, a zona pelúcida homóloga pode ser um material de obtenção bastante complicada, principalmente para ser utilizada em um simples espermograma de rotina. Mesmo para bovinos, em que existe uma maior facilidade na obtenção de oócitos para a utilização da hemizona, o processo de retirada da hemizona pode ser bastante trabalhoso.

A membrana perivitelínica de ovos de aves possui uma homologia com as proteínas ZP3 e ZP2, permitindo sua ligação com espermatozoides de diversas espécies mamíferas. Sendo assim foi desenvolvido o teste de ligação de espermatozoides à membrana perivitelínica de ovos de galinha (BARBATO; CRAMER; HAMMERSTEDT, 1998; WACLAWEK, MARIANNE et al., 1998). Esse teste já foi padronizado para diversas espécies como humanos , aves e suínos (ROBERTSON et al., 1997; AMANN, R. P. et al., 1999; CORCINI et al., 2012).

O teste de ligação de espermatozoides à membrana perivitelínica parece ser bastante eficiente para avaliar indiretamente a capacidade fecundante de uma amostra seminal já que a ligação espermática com essas proteínas é uma etapa crucial para que ocorra a fertilização, além disso, é um teste barato, não necessita de equipamentos sofisticados e relativamente fácil de ser realizado, podendo ser utilizado tranquilamente à campo (CRISCUOLO et al., 2010).

Visto que a maioria dos produtores de bovinos mantêm touros a campo para a realização da monta natural, há uma grande necessidade de conhecer a fertilidade desses animais para evitar uma diminuição nas taxas de prenhez. Pensando nas vantagens deste teste, sua realização em amostras seminais de touros a campo pode ser muito vantajosa.

Hipótese

3 HIPÓTESE

A hipótese deste experimento é que o tratamento antioxidante de touros *Bos taurus taurus* submetidos ao estresse térmico testicular associado a uma suplementação com ácidos graxos poli-insaturados melhora a capacidade de ligação espermática das amostras espermáticas.

Objetivo

4 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento antioxidante sistêmico em touros *Bos taurus taurus* submetidos ao estresse térmico testicular e suplementados com dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados sobre a capacidade de ligação espermática à membrana perivitelínica de ovos de galinha e correlacionar esta capacidade de ligação com os testes funcionais do sêmen (integridade de membrana, integridade acrossomal, atividade mitocondrial, integridade de DNA e avaliação do estresse oxidativo) e os parâmetros de motilidade avaliados através do sistema computadorizado CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).

Capítulo 1

5 CAPITULO 1 - UTILIZATION OF SPERM-BINDING ASSAY COMBINED WITH COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS TO EVALUATE FROZEN-THAWED BULL SEMEN (Trabalho já no formato para envio à revista internacional)

The interaction between spermatozoa and zona pellucida occurs through binding of sperm acrosomal receptors to ZP3 and ZP2 proteins of the zona pellucida. Due to homologies between the chicken egg perivitelline membrane (EPM) with these proteins, sperm of several species are able to bind to this membrane. However, adequate standardization is required to attest possible applications of this technique in the semen evaluation of a given species. Thus, aiming to validate sperm-egg binding assay for bulls, we thawed and divided cryopreserved semen samples in two aliquotes, one kept in water bath at 37°C (thawed sperm) and the other submitted to snap-freezing to damage sperm cells (dead sperm). These aliquotes were then mixed into different ratios of thawed:dead cells and analyzed for motility, membrane integrity, acrosomal integrity and mitochondrial activity. In parallel, chicken egg perivitelline membranes were inseminated with these ratios, and the number of sperm bound per mm^2 of membrane was assessed by conventional microscopy (CM) and computer assisted sperm analysis (CASA). Linear regression showed high correlation between thawed:dead sperm ratio and number of sperm bound to the membrane (CM r^2 = 0.91 and CASA r^2 = 0.92, respectively). Additionally, positive correlations were found between the number of spermatozoa bound to the membrane and acrosomal integrity, membrane integrity, mitochondrial activity, motility, and progressive motility. These findings indicate that sperm-egg binding assay associated with CASA is a reliable, practical and inexpensive method for examining the fertilizing capacity of cryopreserved bull semen.

5.1 INTRODUCTION

Assisted reproduction techniques such as artificial insemination (AI), *in vitro* fertilization (IVF) and intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) are essential for

programs aiming to preserve endangered species, to propagate genetic material of high value animals, and to treat infertility in human medicine (LASLEY; LOSKUTOFF; ANDERSON, 1994; PELLICER et al., 1995; GALLI; LAZZARI, 1996). However, their outcome is highly dependent on sperm quality, which can be impaired due to semen cryopreservation, a key process for the application of these techniques (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990; AITKEN, 2006).

Conventional semen analysis (e.g., sperm motility, vigor, concentration, and morphology) has been routinely used to predict the probability of generating pregnancy with acceptable results (BONDE et al., 1998). However, limitations of this analysis are also known, especially in cases of male idiopathic infertility, due to its inaptitude to detect some functional abnormalities responsible the impaired sperm capacity (SALEH et al., 2003; AITKEN, 2006). In this regard, sperm functional assays are extremely useful since they are capable of evaluating the functionality of distinct cellular structures including plasma membrane (JEYENDRAN et al., 1984), acrosome (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991), mitochondria (GRAVANCE, CURTIS et al., 2000), and DNA (SAKKAS; ALVAREZ, 2010). These techniques are extremely useful to detect the probable cause of cases of unexplained infertility (AITKEN, 2006). A prominent example of such approach is the interaction between spermatozoa and zona pellucida, which appears to predict with considerable accuracy their capacity to fertilize oocytes.

Notwithstanding, tests for sperm-zona pellucida interaction can be strongly influenced by factors as *in vitro* conditions or oocyte variability. Therefore, alternative methods aiming to solely evaluate the sperm binding, not considering further embryo development are very appealing for the routine of reproductive laboratories. Sperm binding to homologous hemizona represents one of these optional diagnostic tools (BURKMAN et al., 1988). Nevertheless, depending on the species, homologous zona pellucida assays exhibit logistical difficulties concerning oocyte availability and excessive labour (Criscuolo et al.,2010). Another option is the zone-free hamster egg penetration test, in which the zona pellucida of hamster oocytes is removed enabling spermatozoa of various species to penetrate the oocyte. Although this technique allows us to assess the penetration capacity of the sperm, the collection of hamster oocytes also is extremely laborious and raises ethical questions around euthanasia (YANAGIMACHI, 1984; KAMIGUCHI; MIKAMO, 1986).

The chicken egg perivitelline membrane (EPM) displays homology to the mammalian ZP3, which enables the binding of spermatozoa from several mammalian species (WACLAWEK, et al., 1998; BAUSEK et al., 2000). Consequently, sperm-egg binding tests using EPM have been validated for poultry, mice, horses, bulls, rams, pigs and humans (ROBERTSON et al., 1997; BARBATO; CRAMER; HAMMERSTEDT, 1998; WACLAWEK, MARIANNE et al., 1998; AMANN, et al., 1999; CORCINI et al., 2012). This technique is relatively simple and requires inexpensive equipment, making it applicable in field studies (CRISCUOLO, 2010). Thus, the objective of the present study was to standardize the sperm-egg binding assay combined with computer assisted sperm analysis (CASA) using chicken's egg perivitelline membrane on bovine cryopreserved semen as an practical alternative to functionally assess indirectly bovine sperm fecundity ability.

5.2 MATERIAL AND METHODS

The sperm binding assay in perivitelline membrane of chicken eggs was performed on six batches of bull cryopreserved semen according to the technique used by Criscuolo et al. (2010) in human semen. However, due to semen peculiarities of each especies, standardization was required in order to test efficacy of this technique using bull semen.

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

5.2.1 Thawing and sperm processing

Cryopreserved semen samples were thawed at 37°C in a water bath, and sperm concentration was measured in a Neubauer chamber. Samples were then diluted to a final concentration of $5x10^6$ spermatozoa per ml using a medium for *in vitro* fertilization at 37°C. Immediately after dilution, samples were divided in two aliquots: one kept in a water bath (37ºC; *"thawed"*), and another submitted to snap freezing to induce cell injury (immersed in liquid nitrogen and thawed in a water bath

at 37° C for three times; *"dead cells"*). Afterwards, these aliquots (thawed and dead sperm, respectively) were mixed in proportions of 0%, 25%, 50%, 75% and 100% (thawed/ dead sperm ratio). From these proportions were performed the sperm binding assay, computerized analysis of motility and function tests.

5.2.2 Egg Perivitelline Membrane (EPM) Processing and Sperm-egg Binding Assay

EPM were isolated from the yolks of freshly laid, unfertilized hen's eggs and washed with PBS until the membrane and PBS became translucent. Later on, EPM segments (0.5 cm^2 each) were transferred to a plate containing wells, and incubated with 25.000 spermatozoa diluted in 250µL of *in vitro* fertilization medium used routinely for cattle (TL semen). This incubation was performed at 37 ° C for 1 hour. After incubation, the membranes were washed in macrocentrifuge tubes containing 10 ml of PBS to remove unbound sperm. Membranes were then placed in a glass slide, overlaid with a cover slip and observed under CASA or phase contrast microscope (400x magnification).

To perform the evaluation of the number of sperm bound to the EPM using the CASA, perivitelline membranes were stretched on microscope slides and submitted to the fluorescent probe Ident® (Hamilton Thorne, USA) according to the manufacturer's instructions. In brief, the stain was diluted in 500 µL of BWW (Biggers-Whitten-Whittinghamw) medium and mixed vigorously using a vortex. Fifty µL of the solution was added to the membrane and incubated for 7 minutes. This staining was used in order to avoid the influence of the membrane on sperm counting. After this period, a cover slip was placed over the membrane and this slide was evaluated using the CASA. Sperm bound to the EPM were counted in 3 to 5 fields, and the results were expressed in sperm bound per mm^2 of membrane. The same procedure was performed in the conventional microscope (CM), where the number of sperm bound to the membrane was evaluated in a 400X magnification (usually in three fields) using a phase contrast microscope (Nikon® E200, Japan). Results were also expressed in number of sperm bound per mm^2 of membrane.

5.2.3 Computer assisted sperm analysis

Ratios of thawed and dead sperm were submitted to motility analysis by computer assisted sperm analysis (CASA, Hamilton-Thorne, Ivos 12.3, USA). The following variables were examined: VAP (average path velocity, μm/s), VSL (straight-line velocity, μm/s), VCL (curvilinear velocity, μm/s) ALH (amplitude of lateral head displacement, μm), BCF (beat cross frequency, Hz) STR (straightness, %), LIN (linearity, %), and the percentage of spermatozoa rapid (%), medium (%), slow (%) and static (%) (GOOVAERTS et al., 2006).

5.2.4 Functional tests

Subsequently to CASA analysis, ratios of thawed/dead sperm were evaluated for mitochondrial activity and integrity of the plasma and acrosome membranes. Integrity of the plasma membrane was investigated by the eosin-nigrosin staining (BARTH; OKO, 1989). To perform the technique, 5μL of eosin/ negrosin stain was mixed with 5 μL of semen on a microscope slide, and smeared using another slide. Later on, two hundred cells were counted in a CM (1000x) and classified as intact and damaged.

Acrosomal integrity was assessed using fast-green/ bengal-rose staining (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991), which was performed by mixing 5μL of stain with 5 μL of semen on a microscope slide. After 60 seconds, this mixture was smeared on the glass slide, and two hundred cells were counted in a CM (1000x) and classified as intact or injured acrossomes. The mitochondrial activity was analyzed using 3.3'diaminobenzidine (DAB) staining (HRUDKA, 1987). An aliquot of each sample was incubated with DAB in an amber microcentrifuge (1:1) for 1 hour at 37°C. After incubation the mixture was smeared in microscopy slides, and fixed in 10% formalin for 10 minutes. Slides were then examined under phase contrast microscope (1000x), where two hundred cells were counted and classified in four different classes: *Class I* with 100% of the midpiece stained indicating full mitochondrial activity; *Class II* with more than 50% of the midpiece stained indicating medium activity; *Class III* with less than 50% of the midpiece stained indicating low activity;

and *Class IV* with absence of staining in the midpiece indicating no mitochondrial activity.

5.2.5 Statistical Analysis

All data were evaluated using SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The effect of proportion of live/dead cells (0, 25, 50, 75 ans 100%) was determined using parametric (General Linear Model procedure–PROC GLM) and non-parametric (Wilcoxon) tests, according to the residue normality (Gaussian distribution) and variance homogeneity of each variable. A probability value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Results are reported as untransformed means ± S.E.M. Pearson correlation was used to calculate the relationship between variables studied in each temperature group.

5.3 RESULTS

Increases in the number of sperm bound to the EPM followed rises in the ratio of thawed/dead sperm in both CASA (0%: 1.43 ± 0.35; 25%: 3.53 ± 0.67; 50%: 7.50 ± 1.14; 75%: 14.50 ± 1.50; and 100%: 21.25 ± 2.25) and CM analysis (0%: 1.07 ± 1.0; 25%: 6.79 ± 3.02; 50%: 21.13 ± 5.97; 75%: 64.49 ± 1.96; 100%: 100.14 ± 6.12; Table 1). In fact, linear regression coefficients showed a consistent relationship between these two parameters in both techniques (Figure 6).

Similarly, membrane and acrosome integrities increased according to raises in the proportion of thawed/dead sperm (Table 1), circumstance also observed in the percentage of sperm showing full mitochondrial potential. On the other hand, percentages of sperm showing medium, low and absence of mitochondrial activity (DAB II, DAB III and DAB IV, respectively) decreased with the increment of thawed/dead spermatozoa (Table 1). As expected, percentages of sperm showing total and progressive motilities increased whenever ratios of thawed/dead sperm were elevated, and the opposite occurred with the percentage of static sperm.

Positive correlation was found regarding CASA and CM analysis of the number of sperm bound to EPM (0.962, p <0.0001). Moreover, both techniques were positively correlated with the plasma membrane integrity (CASA - 0.845, p <0.0001, and CM 0.846, p <0.0001, Table 2), acrosome integrity (CASA 0.846, p <0.0001; CM 0.788, p <0.0001, Table 2) and DAB I (CASA: 0.759, p <0.0001; microscope: 0.768, p <0.001, Table 2). Additionally, we demonstrated robust correlations between the number of sperm bound to EPM and variables provided by the CASA, exceptions made for VAP, VSL, VCL and BCF (data not shown). Correlations were positive for ALH, STR, LIN, Mot, Prog, Rapid, Medium and Slow, and negative for Static (Table 3).

Table 1 - . Relationship among thawed/dead sperm ratios and the following variables: number of spermatozoa bound to EPM evaluated by CASA (Esp/mm2 - CASA) and CM (Esp/mm2 - CM), plasma membrane integrity (intact), integrity acrosomal (acro), mitochondrial activity (DAB I, II, III and IV), total motility (MOTILE), progressive motility (PROG) and statics spermatozoa (STATIC).

	Ratio (thawed/dead sperm)				
	0%	25%	50%	75%	100%
Esp/mm^2(CASA)	1.43 ± 0.35^{d}	3.53 ± 0.67^{d}	7.50 ± 1.14^{c}	14.50 ± 1.50^{b}	21.25 ± 2.25^{a}
Esp/mm^2(CM)	1.07 ± 1.01^{d}	6.79 ± 3.02^{d}	21.13 ± 5.97^{c}	64.49 ± 1.96^{b}	100.14 ±6.12^{a}
INTEGRO	0.17 ± 0.17^{d}	9.00 ± 1.32^{d}	23.83 ± 3.18^{c}	34.33 ± 3.57^{b}	46.00 ± 4.78^{a}
ACRO	27.50 ± 4.37^{e}	44.33 ± 4.73^{d}	59.17 ± 3.54^{c}	72.67 ± 2.69^{b}	85.67 ± 2.25^{a}
DABI	9.33 ± 5.11^{c}	19.50 ± 5.12^{c}	36.50 ± 5.31^{b}	46.67 ± 6.58^{b}	66.50 ± 6.00^{a}
DABII	40.67 ± 2.60^{a}	38.67 ± 2.65^{a}	42.00 ± 3.62^{a}	34.17 ±3.79^{ab}	25.83 ± 4.06^{b}
DABIII	33.50 ± 4.86^{a}	27.50 ± 4.10^{a}	15.00 ± 3.99^{b}	14.00 ± 2.18^{b}	4.83 ± 1.19^{b}
DABIV	16.17 ± 2.77^{a}	14.50 ± 3.19^{a}	6.50 ± 1.38^{b}	5.17 ± 1.14^{b}	2.83 ± 1.01^{b}
MOTILE	0.00 ± 0.00^{c}	1.50 ± 0.43^{c}	3.00 ± 0.26^{bc}	6.00 ± 0.89^{b}	16.00 ± 2.18^{a}
PROG	0.00 ± 0.00^{c}	0.17 ± 0.17^{c}	1.20 ± 0.49^{bc}	4.20 ± 1.11^{b}	8.83 ± 2.10^{a}
STATIC	99.33 ± 0.67^{a}	94.67 ±1.98^{ab}	83.80 ±5.56^{ab}	79.40 ± 3.88^{b}	60.00 ±10.29^{c}

^{a,b,c}: Different superscripts in the same line indicate statistical differences (p<0.05)

Figure 6 - Linear regression between thawed / dead sperm ratios with CASA and Microscope analysis of the number of sperm bound per mm^2 of EPM

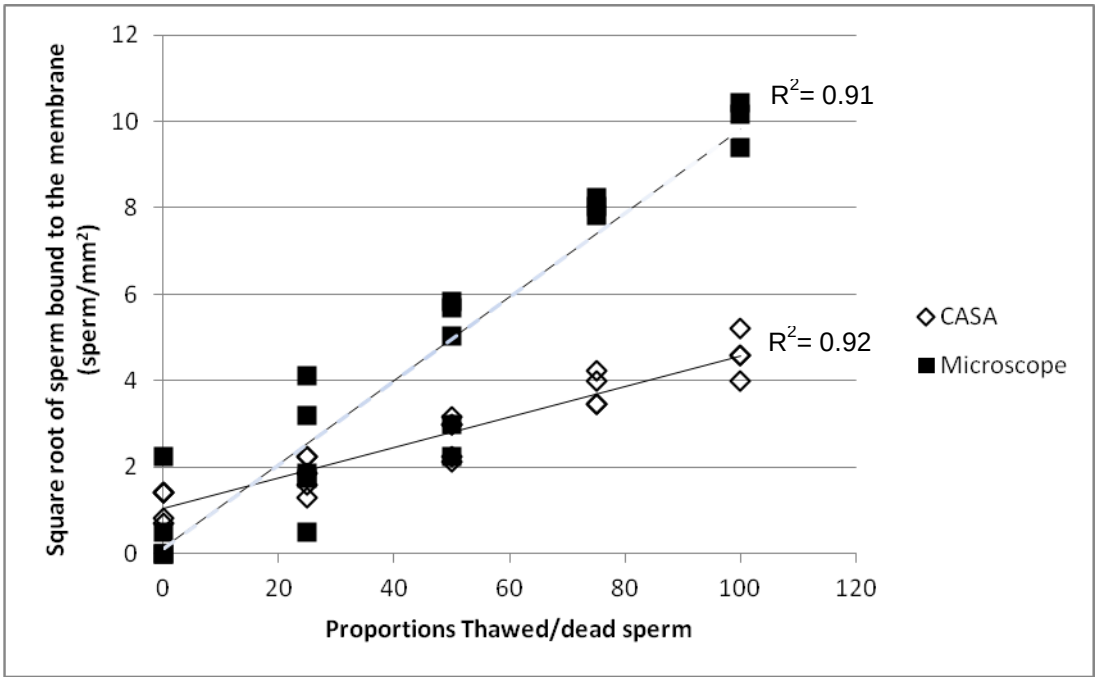


Table 2 - Correlations among analysis of the number of sperm bound per mm^2 (CASA and CM) and values of plasma membrane integrity (IM), acrosomal integrity (IA) and mitochondrial activity (DAB I, II, III and IV).

	Esp/m^2 (CASA)	Esp/mm^2 (micro)	IM (%)	IA (%)	DAB I (%)	DAB II (%)	DAB III (%)	DAB IV (%)
Esp/mm^2 (CASA)	1,0000	0,962 (<0,0001)	0,845 (<0,0001)	0,846 (<0,0001)	0,759 (<0,0001)	-0,490 (<0,017)	-0,624 (<0,0015)	-0,624 (<0,001)
Esp/mm^2 (CM)		1,0000	0,846 (<0,0001)	0,788 (<0,0001)	0,768 (<0,001)	-0,489 (<0,0242)	-0,633 (<0,0021)	-0,705 (<0,0003)

Table 3 - Correlations among analysis of the number of sperm bound per mm^2 (CASA and CM) and other sperm parameters assessed by CASA

	ALH (µm)	STR (%)	LIN (%)	Mot (%)	Prog (%)	Rapid (%)	Medium (%)	Slow (%)	Static (%)
Esp/mm^2 (CASA)	0,738 (<0,0001)	0,583 (<0,0043)	0,628 (<0,0017)	0,890 (<0,0001)	0,861 (<0,0001)	0,867 (0,0001)	0,445 (<0,0379)	0,435 (<0,0425)	-0,686 (<0,0004)
Esp/mm^2 (CM)	0,650 (<0,0014)	0,540 (<0,0115)	0,642 (<0,0017)	0,806 (<0,0001)	0,919 (0,0001)	0,932 (<0,0001)	0,484 (<0,0260)	0,557 (<0,0086)	-0,711 (<0,0003)

5.4 DISCUSSION

Assays that can predict fertilizing capacity of semen samples are extremely valuable in the routine of a laboratory, especially when expensive assisted reproductive techniques are required or rare and high value genetic materials are used (Aitken, 2006). However, despite the presumable accuracy of some functional assays, the assessment of the sperm-zona pelucida binding seems to predict with higher accuracy the fertilizing capacity of a given sample (BARBATO; CRAMER; HAMMERSTEDT, 1998; AMANN, et al., 1999). Hence, considering the homology of EPM proteins to the some mammalian ZPs, sperm-egg binding assays figure as an inexpensive and practical method to complement conventional and functional semen analysis (Barbato et al. 1998; (BAUSEK et al., 2000; MANN, 2008).

The sperm capacity from different species to bind to the EPM have been previously reported by Barbato et al. (1998). These authors verified a relationship between fertility and the number of rooster spermatozoa bound to the EPM. Notwithstanding, during the standardization of this technique in other species (such as horses, rat, human, and bovine) they only showed that an increase in the number of sperm applied on the EPM rendered a rise in the number of cells bounded to it. Herein, we kept sperm concentrations constant and changed amounts of viable cells, which in our case proved that the number of sperm bound to the EPM is highly correlated by the ratio of thawed/dead sperm. Likewise, positive correlation was found between CASA and CM, indicating that both techniques could be used; the faster and more representative evaluation performed by CASA, or the more inexpensive analysis achieved by CM.

The ability of sperm from several species to bind to the EPM is closely related to homologies between proteins from the membrane and mammalian ZPs, especially the ZP3 (BAUSEK et al., 2000; MANN, 2008). In mammals, the zona pellucida is composed of three component glycoproteins, which are highly conserved across the several species studied (HARRIS et al., 1994). These proteins are called ZP1, ZP2, and ZP3 (also known as ZPB, ZPA, and ZPC, respectively). Little is known regarding the molecular composition of the perivitelline membrane. However, a 34 kDa proteins, similar to the ZP3 has been identified as one of the major components of the membrane (BAUSEK et al., 2000). In fact, the ZP3 appears to the primary

receptor responsible for the binding of spermatozoa to the oocyte and the induction of the acrosome reaction (HINSCH; HINSCH, 1999). However, the successful binding depends on sperm acrosome integrity, which, in our study was verified by the high correlation found between acrosomal integrity and the number sperm bound to the membrane for both evaluation methods (CASA: 0,846- p<0,0001; microscopy: 0,788- p<0,0001). Also, this correlation may indicate that thie technique may be also used as an indirect method to assess acrosomal status, essential for sperm oocyte functional interaction (BARBATO; CRAMER; HAMMERSTEDT, 1998; AMANN, et al., 1999).

The importance of mitochondria for sperm functionality have been demonstrated widely; mitochondria is the main source of energy necessary for motility and cellular homeostasis (TRAVIS et al., 1998; ST. JOHN, 2002). Despite recent studies indicating the role of glycolysis on sperm motility rather than mitochondrial oxidative phosphorylation (MUKAI; OKUNO, 2004; FORD, 2006; NASCIMENTO et al., 2008), mitochondria appears to be a key organelle for both physiological and pathological conditions. As a source of reactive oxygen species (ROS) (KOPPERS et al., 2008), mitochondria may influence sperm hyperactivation (DE LAMIRANDE.; CAGNON, 1993), capacitation (AITKEN et al., 2004), acrosome reaction (GRIVEAU; RENARD; LANNOU, 1995; DE LAMIRANDE, et al., 1998), binding to the oocyte and zona pelucida (AITKEN, et al., 1995) , processes that are dependent of limited concentrations of ROS. However, a higher production of ROS will lead to the oxidative stress, which may be caused by damages to the mitochondria with the release of pro-oxidative factors (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999; KOPPERS et al., 2008). The oxidative stress is known to cause damages to the sperm acrosome, membrane and DNA (GRIVEAU; LANNOU, 1997; HALLIWELL, 1999), leading to impaired fertilizing capacity. This could be observed in our results, in which a high correlation was found between the number of sperm bound to the perivitelline membrane and mitochondrial activity; positive for the full mitochondrial activity (DAB I) and negative for all classes showing impaired activity (DAB II, III and IV).

Several studies have been performed aiming to correlate the variables obtained using the computer assisted sperm analysis with fertility (HIRANO et al., 2001; SHIBAHARA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2013). Similarly to our study, correlations were found between total motility and progressive motility with

conception rates in cows (OLIVEIRA et al., 2013). Also, the amplitude of lateral head displacement has been demonstrated to present a strong correlation with both *in vitro* and *in vivo* fertility (HIRANO et al., 2001; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; OLIVEIRA et al., 2013). Despite the absence of correlations between VSL,VCL, VAP, and BCF with the sperm ability to bind to the perivitelline membrane observed in the present study, Verstegen, Iguer-Ouda et al. (2002) have previously verified that semen samples that generate more than 50% of fertilized oocytes showed higher values in these variables, when compared to samples generating less than 50% of zygotes. Also, several studies have demonstrated a correlation between these variables and fertilization rates (BARRATT; TOMLINSON; COOKE, 1993; IRVINE et al., 1994; COX et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2013). Therefore, the importance of these variables for fertility assessment should not be ignored. However, for all subpopulations of motile sperm (i.e., rapid, medium and slow), positive correlations were found with the number of sperm bound to the membrane. These results may indicate that regardless of velocity, even slow sperm are able to fertilize. Further studies are necessary to assess the real contribution of each motility trait for fertility; however, the sperm binding test may be an important tool to establish standard parameters of motility of fertile samples.

In conclusion, our results indicate that the sperm-egg binding assay using may be a valuable parameter to determine sperm viability in cryopreserved bull semen. However, further *in vivo* studies are necessary to establish the validity of this assay under field conditions.

Capítulo 2

6 CAPITULO 2 - EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SISTÊMICO EM TOUROS BOS TAURUS TAURUS SUBMETIDOS AO ESTRESSE TÉRMICO E SUPLEMENTADOS COM DIETA RICA EM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS SOBRE A CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES À MEMBRANA VITELÍNICA DE OVOS DE GALINHA.

No presente capítulo será descrito o efeito do tratamento com vitamina E em touros Bos taurus submetidos à insulação escrotal associado a suplementação com PUFAs na capacidade fecundante do sêmen avaliada através do teste de ligação de espermatozóides à membrana perivitelínica de ovos de galinha que foi previamente padronizado e descrito no capítulo anterior.

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma Chemical® (St. Louis, MO, USA) sendo que as exceções serão informadas sempre que necessário.

6.1.1 Animais utilizados no experimento

O presente experimento foi realizado na Fazenda Paineiras localizado no Município de Brotas-SP. Foram utilizados 16 touros *Bos taurus taurus* da raça Holandês preto e branco (HPB) com aproximadamente 2 anos de idade.

6.1.2 Manejo e nutrição

Os animais foram mantidos em piquetes coletivos de 0,5 hectare cultivados com a forrageira *Brachiaria decumbens* e com sombreamento natural de árvores. A taxa de lotação foi de 8 animais por piquete.

O fornecimento de água foi *ad libitum* em cochos de concreto higienizados semanalmente. Além dos animais se alimentarem da forrageira *Brachiária*

Decumbens cultivada nos piquetes a dieta foi a base de cana de açúcar picada (18kg/MS/animal/dia), sal mineral comercial Fosbov® (20-200g/animal/dia) e concentrado a base de aveia (2Kg/animal/dia) sendo que a alimentação foi dividida em 2 tratos diários.

Os animais foram manejados em um curral de madeira coberto com tronco de contenção tanto para realização do experimento quanto para administração de vacinas, vermífugos e pulverização com ectoparasiticidas.

6.1.3 Insulação escrotal

Todos os animais foram submetidos à insulação escrotal através de bolsas plásticas contendo algodão em seu interior durante um período de 4 dias para mimetizar um quadro de degeneração testicular, sendo que a temperatura testicular no interior da bolsa foi aferida para garantir que havia uma temperatura maior do que a temperatura testicular fisiológica.

O objetivo de causar a degeneração testicular neste experimento, foi para estudar tratamentos que melhorem a qualidade espermática de touros europeus criados em climas tropicais e consequentemente com quadro de degeneração testicular causado pelo estresse térmico.

Anteriormente à insulação escrotal, foi realizado exame andrológico e avaliação do perfil espermático, utilizado como controle do experimento (tempo 0). No momento em que os animais foram desinsulados essas avaliações foram feitas novamente para avaliação da qualidade espermática frente a uma degeneração testicular (tempo 1) e a partir deste momento os animais foram submetidos aos tratamentos propostos no experimento.

6.1.4 Tratamentos

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 lotes e submetidos a um arranjo fatorial, sendo um dos fatores a dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) e o outro fator, o tratamento com vitamina E injetável, sendo que esses tratamentos tiveram uma duração de 60 dias após os animais serem desinsulados.

Para fins de análise estatística (medidas repetidas no tempoi), os grupos foram considerados como 4 tratamentos isolados, a saber, Grupo controle, Grupo Vitamina E, Grupo PUFA e Grupo PUFA + Vitamina E.

A dieta rica em PUFA foi realizada através da adição de 4 Kg de Megalac® na dieta desses animais dividido em duas porções diárias, já o tratamento sistêmico com vitamina E foi realizado através da injeção intramuscular contendo uma dose de 3000UI de α-tocoferol (Monovin E®) que foi administrada a cada 13 dias. Aos animais que não receberam vitamina E, foi adiministrado o mesmo volume em placebo (óleo inerte).

6.1.5 Colheita do sêmen

O sêmen foi colhido por eletroejaculação em tubo graduado de 15 mL, isolado de choque térmico e da luz através de uma capa térmica, sendo que para tal procedimento os animais foram devidamente contidos em troncos apropriados. Anteriormente a colheita foi realizada uma higienização interna e externa do prepúcio com solução fisiológica, assim como o corte dos pelos que circundam o óstio prepucial.

As colheitas de sêmen foram realizadas no tempo 0 (antes da insulação), tempo 1 (imediatamente após a retirada das bolsas de insulação), tempo 45 (45 dias após o início do tratamento) e tempo 60 (60 dias após o início do tratamento).

6.1.6 Avaliações do sêmen

As avaliações do sêmen foram iniciadas imediatamente após a colheita seminal, sendo que foram realizados tanto testes convencionais quanto testes funcionais do sêmen.

Uma alíquota do sêmen foi submetida ao processo de criopreservação, 2 alíquotas de sêmen foram armazenadas em criotubos e congeladas diretamente no nitrogênio líquido para posterior dosagem de antioxidantes e avaliação do estresse oxidativo, e uma última alíquota foi armazenada em tubo de microcentrífuga e

congelada em freezer convencional para posterior avaliação da fragmentação de DNA

6.1.6.1 Testes convencionais para análise de sêmen

Os testes convencionais eram realizados imediatamente após a colheita, sendo que o volume, aspecto, coloração e odor foram avaliados no próprio tubo de colheita graduado em mililitros (Tubo de macrocentrífuga de 15mL).

A avaliação da motilidade total e progressiva, assim como a concentração espermática (avaliada em milhões de espermatozoides por mL) foram avaliados através do Sistema Computadorizado da Motilidade (CASA- Computer Assisted Sperm Aanalysis; Hamilton-Thorne). Para estas avaliações foi colocada uma alíquota de sêmen contendo 6 microlitros em uma câmara de contagem específica para o aparelho (Leja 4, Hamilton Thorne, USA).

Para a avaliação da morfologia espermática era colocada uma alíquota de sêmen em um tubo de microcentrífuga contendo formol salino aquecido a 37°C, sendo que a diluíção para essa avaliação foi variável dependendo do aspecto do sêmen. Posteriormente uma gota do sêmen foi colocado entre lâmina e lamínula (câmara úmida) e a avaliação morfológica foi realizada em um microscópio de contraste de fases em um aumento de 1000x sob óleo de imersão.

6.1.6.2 Análise computadorizada da motilidade (casa)

Como já foi descrito anteriormente a motilidade total e progressiva foram avaliados pelo Sistema Computadorizado da Motilidade (CASA- Computer Assisted Sperm Aanalysis; Hamilton-Thorne), sendo que estas avaliações eram expressas em porcentagem de células móveis e com movimento progressivo.

Além das motilidades, outros parâmetros de movimento espermático foram avaliados e estão descritos abaixo no quadro 1.

Quadro 1 - Siglas, características do movimento espermático e seus respectivos significados

Sigla	Terminologia	Significado
VAP	Velocidade média de percurso (μm/s)	Velocidade média do espermatozoide considerando-se um caminho suavizado.
VSL	Velocidade retilínea (μm/s)	É a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide
VCL	Velocidade curvilínea (μm/s)	É a velocidade da trajetória real do espermatozoide
ALH	Amplitude do movimento lateral da cabeça (μm)	É a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real.
BCF	Frequência de batimento cruzado (Hz)	É o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento
STR	Retilinearidade (VSL/VAP, %)	Qualidade do movimento retilíneo suavizado percorrido
LIN	Linearidade (VSL/VCL, %)	Qualidade do movimento retilíneo real percorrido

Fonte: Verstegen, Iguer-ouada e Onclin (2002) e Goovaerts et al. (2006)

Além desses parâmetros os espermatozoides também foram divididos em 4 grupos baseando-se nas respectivas velocidades, sendo classificados como: Rápidos (RAPID; VAP > 50 μm/s; %), Médios (MEDIUM, 30 μm/s < VAP < 50 μm/s; %) e Lentos (SLOW; VAP < 30 μm/s ou VSL < 15 μm/s; %) e espermatozoides imóveis (STATIC; %).

6.1.6.3 Testes funcionais para análise de sêmen

Os testes funcionais utilizados no presente experimento foram avaliação das integridades da membrana plasmática e acrossomal, da atividade mitocondrial e integridade do DNA espermático.

6.1.6.4 Integridade de membrana

Para avaliação da integridade de membrana plasmática foi utilizada a coloração Eosina-Nigrosina. Nesta técnica, espermatozoides com lesões ou alterações de permeabilidade de membrana permitem que a Eosina entre nessas células e as core de rosa enquanto nos espermatozoides íntegros o corante não consegue penetrar e por isso, o espermatozoide contrastando com a coloração de fundo da nigrosina são visualizados na cor branca (BARTH.; OKO, 1989)

Para a realização da técnica, uma alíquota de 5µL de corante foi misturado a uma alíquota de 5µL de sêmen sobre uma lâmina de microscopia e posteriormente foi realizado um esfregaço .As lâminas foram analisadas em um microscópio convencional em aumento de 1000x sob óleo de imersão. Foram contadas 100 células e estas foram classificadas em membranas íntegras e membranas lesionadas sendo expressas em porcentagem.

6.1.6.4.1 Integridade acrossomal

Para a avaliação da integridade acrossomal foi realizada a coloração Fast-Green/Rosa Bengala (Coloração de Pope). . Nesta coloração, o acrossoma íntegro é corado de roxo, ficando mais escuro que a região pós-acrossomal enquanto o acrossoma lesionado fica com uma coloração rósea, mais clara que a região pós acrossomal (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991).

Para a realização da técnica, uma alíquota de 5µL de corante foi misturado a uma alíquota de 5µL de sêmen sobre uma lâmina de microscopia e posteriormente foi realizado um esfregaço .As lâminas foram analisadas em um microscópio convencional em aumento de 1000x sob óleo de imersão. Foram contadas 100 células e estas foram classificadas em acrossomos íntegras e acrossomos lesionados sendo expressos em porcentagem.

6.1.6.4.2 Atividade mitocondrial

O teste utilizado para avaliar a atividade mitocondrial foi o DAB (Diaminobenzidina) .Neste teste, a diaminobenzidina, ao entrar em contato com o Citocromo C-Oxidase, (enzima que desempenha um papel importante no metabolismo aeróbio das mitocôndrias), é oxidada formando um complexo de coloração marrom que se deposita em mitocôndrias ativas, sendo possível observar essas mitocôndrias coradas em microscopia com contraste de fase (HRUDKA, 1987).

Para a realização desta técnica, uma alíquota da amostra foi incubada junto à Diaminobenzidina em um tubo de microcentrífuga âmbar em uma proporção de 1:1 durante 1 hora em banho-maria a 37°C. Após a incubação foi realizado um esfregaço em lâminas de microscopia em local protegido da luz, sendo que esta lâmina foi posteriormente fixada em formol 10% durante 10 minutos.

A leitura das lâminas foi realizada em microscopia com contraste de fase em um aumento de 1000x sob óleo de imersão, onde foram contadas 100 células e classificadas em 4 classes de acordo com a porcentagem de mitocôndrias coradas de marrom, portanto ativas, sendo classificadas em: alta atividade mitocondrial (Classe I), média (Classe II), baixa (Classe III) e ausência de atividade mitocondrial (Classe IV).

6.1.6.4.3 Integridade de DNA

O teste utilizado para avaliar a intergidade de DNA foi o ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA). Neste teste, a amostra é submetida a um desafio ácido, pelo qual é possível avaliar a susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida (EVENSON et al., 1999).

Para a realização desta técnica uma alíquota de sêmen foi diluído em tampão TNE na concentração de 2 x 10^6 células/mL. Um volume de 0,1 mL da diluição foi incubado com 0,2 ml de solução detergente (1% de Triton X-100) por 30 segundos para permitir o acesso da laranja de acridina ao DNA espermático. Após este período o sêmen foi incubado com 0,6ml de solução de laranja de acridina (6µg/ml).

As amostras foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo, com excitação de 488 nm e 15 mW.

A avaliação foi baseada na diferença entre a fluorescência emitida pelos espermatozóides com DNA íntegro, que emitem fluorescência verde e os com DNA fragmentado, que emitem fluorescência vermelha.

6.1.7 Processamento e criopreservação do sêmen

Após as avaliações de motilidade e concentração espermática, uma alíquota de sêmen foi diluída em meio comercial Bovimix® a fim de se obter uma concentração final de $20x10^6$ espermatozoides por mL e armazenada em palhetas de 0,5 mL envasadas e raqueadas em temperatura ambiente (aproximadamente 23°C).

Após o envase e armazenagem em raques, as amostras foram submetidas a refrigeração com temperatura controlada a 5°C durante 2 horas. Imediatamente após a refrigeração as raques foram colocadas em um isopor a uma altura de 3 cm de distância do nitrogênio líquido durante 20 minutos e logo após as raques foram imersas em nitrogênio líquido e posteriormente foram armazenadas em um botijão de nitrogênio líquido.

As palhetas de sêmen criopreservadas foram descongeladas em banho-maria, a 37°C durante um tempo mínimo de 30 segundos para posteriores avaliações.

6.1.8 Avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo

A avaliação das amostras a susceptibilidade ao estresse oxidativo foi realizada peloteste desenvolvido por Ohkawa et al. (1979) chamado comumente de “TBARS induzido”. Nesse teste é induzida uma peroxidação lipídica nas amostras. Esta abordagem é realizada para se comparar qual dos grupos estudados é mais ou menos susceptível a sofrer o estresse oxidativo.

A peroxidação lipídica das amostras foi induzida por incubação em 50µL de ácido ascórbico (20mM) e 50 µL de sulfato de ferro (4mM) junto a 200µl de sêmen em banho-maria durante uma hora e meia. Esta técnica de indução foi adaptada de Gomez et al. (1998).

Após a indução, junto aos 300 µL de amostra (sêmen com adição de sulfato de ferro e ácido ascórbico) foram adicionados 600 µL de ácido tricloroacétido a 10% (TCA 10%). A amostra foi então centrifugada na capacidade máxima de rotação da centrífuga, durante 15 minutos a uma temperatura de 5 °C para que ocorra a precipitação das proteínas da amostra.

Alíquotas de 800µL de sobrenadante foram transferidas para criotubos, nas quais foram adicionados 800 µL de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA 1%). Estes tubos posteriormente foram submetidos à fervura durante 10 minutos e posteriormente eram imersos em gelo para que a reação não continue ocorrendo.

Após ocorrer a peroxidação lipídica da membrana espermática decorrente de um estresse oxidativo, ocorrerá a formação de alguns produtos que são consequência desta peroxidação, sendo o malondialdeído (substância reativa ao ácido tiobarbitúrico) o principal produto formado (NICHI et al., 2006a)

Ao adicionar o TBA na amostra, este ácido irá reagir com o malondialdeído formando uma coloração rósea. Esta coloração rósea das amostras foi quantificada em um espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences) com comprimento de onda de 532 nanômetros. Sendo assim a avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo foi expressa em nanogramas de TBARS/ 10^6.espermatozóides

6.1.9 Teste de ligação espermática

O teste de ligação espermática em membrana perivitelínica de ovos de galinha foi realizado nas amostras de sêmen descongeladas dos tempos 0, 1, 45 e 60 para os 4 grupos avaliados (PUFA + vitamina E, PUFA / sem vitamina E, vitamina E / sem PUFA e sem PUFA / sem vitamina E).

6.1.9.1 Técnica de ligação espermática

As membranas cortadas em quadrados de aproximadamente 0,5 cm^2 eram transferidas das placas de petri para uma placa contendo poços, onde eram incubadas com 25.000 espermatozoides diluídos em 250 µL de meio de fertilização *in vitro* (FIV) utilizado para bovinos (TL sêmen). Essa incubação era realizada em estufa a 37°C durante 1 hora.

Após a incubação, as membranas eram lavadas em tubos de macrocentrífuga contendo 10 mL de PBS para retirar os espermatozoides não ligados. Em seguida, as membranas foram avaliadas entre lâmina e lamínula para a quantificação dos espermatozóides ligados à membrana.

6.1.9.2 Avaliação da ligação espermática

A avaliação do número de espermatozoides ligados à membrana foi realizada tanto através da microscopia convencional quanto através do sistema computadorizado da motilidade espermática.

6.1.9.2.1 Avaliação da ligação espermática pelo CASA

Para avaliar a ligação espermática através do CASA, as membranas perivitelínicas após serem esticadas em lâminas de microscopia, foram incubadas durante 7 minutos com a sonda fluorescente Ident® (Hamilton Thorne, USA) utilizada especificamente para corar o DNA espermático para fazer avaliações no CASA.

Após esse período de incubação, foi colocada uma lamínula sobre a membrana e esta lâmina foi levada ao sistema computadorizado de avaliação seminal. O Ident, sonda fluorescente utilizada em amostras apresentando muitos artefatos, foi utilizado visto que a membrana impedia que o sistema identificasse as células espermáticas. Foram contados os espermatozoides ligados a membrana de

3 a 5 campos, sendo os resultados expressos em espermatozóides ligados por mm^2 de membrana.

6.1.9.2.2 Avaliação da ligação espermática pela microscopia convencional

O mesmo procedimento foi realizado no microscópio convencional onde eram contados o número de espermatozoides ligados (geralmente em 3 campos) em um aumento de 40x. Os resultados foram também expressos em número de espermatozoides ligados por mm^2 de membrana.

6.1.10 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa do SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). Os efeitos dos grupos (Controle, Vitamina E, PUFA, PUFA + Vitamina E), dos tempos (0, 1, 45 e 60 dias) e da interação Grupo*Tempo foram determinados pelo PROC MIXED de Medidas Repetidas no Tempo. Diferenças entre os tratamentos foram avaliadas por métodos e não paramétricos, de acordo com a normalidade dos resíduos (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias.

Um valor de probabilidade de $p < 0,05$ foi considerado significante. Os resultados foram descritos pelas médias não transformadas ± os erros padrões das médias (EPM). As correlações de Pearson e Spearman foram utilizadas para calcular a relação entre as variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente, para cada um dos grupos de tratamentos avaliados.

6.2 RESULTADOS

Não foram observadas interações significativas entre grupo e tempo para nenhumas das variáveis avaliadas no presente estudo. Desta forma foi avaliado o efeito do grupo independente do Tempo de avaliação e do tempo de avaliação independente do grupo (Tabela 4).

Tabela 4 - Probabilidades para o efeito do Grupo (Controle, Vitamina E, PUFA e PUFA+VitaminaE), do tempo (0, 1, 45 e 60 dias) e da interação entre grupo e tempo na avaliação funcional e nas variáveis avaliadas pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).em sêmen criopreservado de touros Bos taurus submetidos à insulação escrotal – São Paulo – 2013

	Grupo	Tempo	Grupo * Tempo
SCSA	0,2858	<0,0001	0,7972
INTEGRO	0,1020	0,9564	0,6297
ACRO	0,0034	0,0002	0,1120
DABI	0,1780	0,0308	0,8862
DABII	0,6456	0,0167	0,9100
DABIII	0,6051	0,5502	0,2819
DABIV	0,0472	0,5092	0,3424
TBARS	0,0530	0,0291	0,4210
ESPMMCASA	0,7129	0,4733	0,6079
ESPMMMICRO	0,6183	0,9602	0,5774
VAP	0,0014	0,3120	0,3876
VSL	0,0028	0,4083	0,3734
VCL	0,0090	0,6696	0,3957
MOTILE	0,1102	0,8165	0,8724
PROG	0,0683	0,4501	0,8143
RAPID	0,0536	0,5802	0,9074

Testes funcionais: SCSA (avaliação da susceptibilidade da cromatina a denaturação ácida), ÍNTEGRO (integridade de membrana plasmática), ACRO (integridade acrossomal), DAB I (alta atividade mitocondrial), DAB II (média atividade mitocondrial), DAB III (baixa atividade mitocondrial), DAB IV (ausência de atividade mitocondrial), TBARS (avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo), ESPMMCASA (número de espermatozóides ligados por mm^2 de membrana perivitelínica avaliado através do CASA) ESPMMMICRO (número de espermatozóides ligados por mm^2 de membrana perivitelínica avaliado através da microscopia convencional). Variáveis do CASA: VAP (µm/s, Velocidade média de percurso),VSL(µm/s Velocidade retilínea), VCL (µm/s, velocidade curvilínea, MOTILE (%, motilidade total), PROG (%, motilidade progressiva), RAPID (%, espermatozóides com velocidade rápida).

6.2.1 Efeito do Grupo

Os animais tratados apenas com Vitamina E apresentaram uma maior porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra quando comparado com os grupos suplementados com PUFA, tanto isoladamente como quando associada à própria Vitamina E (controle: 39,92 ± 4,99^{ab}; PUFA: 30,92 ± 4,56^{a}; vitamina E: 48,60 ± 3,92^{b}; PUFA + vitamina E: 34,69 ± 5,24^{a}; Tabela 5). O grupo vitamina E e o grupo controle apresentaram uma maior porcentagem de espermatozóides com acrossomo íntegro quando comparados ao grupo PUFA (controle: 63,83 ± 5,72^{a}; PUFA: 43,08 ± 4,55^{b}; vitamina E: 63,30 ± 5,74^{a}; PUFA+vitamina E: 52,08 ± 4,91^{ab}; Tabela 5). No entanto, uma susceptibilidade ao estresse oxidativo foi encontrada nos grupos controle e Vitamina E quando comparados ao grupo suplementados com PUFA (controle: 1702,19^{a} ± 216,61; PUFA: 1062,44 ± 99,27^{b}; vitamina E: 1858,29 ± 313,11^{a}, PUFA + vitamina E: 1358,53 ± 196,13ab).

Tabela 5 - Efeito do tratamento com Vitamina E, da suplementação com PUFA e da combinação PUFA+Vitamina E sobre as avaliações funcionais do sêmen criopreservado de touros *Bos taurus* submetidos à insulação escrotal – São Paulo – 2013

	Controle	PUFA	Vitamina E	PUFA + Vitamina E
SCSA	34,94 ± 9,05	45,73 ± 9,22	40,75 ± 10,50	31,24 ± 7,90
INTEGRO	39,92 ± 4,99^{ab}	30,92 ± 4,56^{a}	48,60 ± 3,92^{b}	34,69 ± 5,24^{a}
ACRO	63,83 ± 5,72^{a}	43,08 ± 4,55^{b}	63,30 ± 5,74^{a}	52,08 ± 4,91^{ab}
DABI	58,17 ± 5,19	45,18 ± 5,50	54,64 ± 3,83	43,85 ± 5,86
DABII	18,67 ± 2,63	23,42 ± 3,40	24,64 ± 2,88	18,77 ± 3,02
DABIII	6,08 ± 1,90	6,75 ± 0,82	4,00 ± 0,89	6,31 ± 1,22
DABIV	17,00 ± 3,02	27,25 ± 5,84	16,91 ± 3,94	31,15 ± 6,33
TBARS	1702 ± 216^{a}	1062 ± 99^{b}	1858 ± 313^{a}	1358 ± 196^{ab}
ESPMMCASA	21,70 ± 8,50	23,92 ± 7,24	49,61 ± 28,68	27,27 ± 8,63
ESPMMMICRO	13,81 ± 4,56	13,66 ± 6,58	33,06 ± 15,09	19,69 ± 11,30

^{a,b}: Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos (linhas; p<0,05)

Testes funcionais: SCSA (avaliação da susceptibilidade da cromatina a denaturação ácida), ÍNTEGRO (integridade de membrana plasmática), ACRO (integridade acrossomal), DAB I (alta atividade mitocondrial), DAB II (média atividade mitocondrial), DAB III (baixa atividade mitocondrial), DAB IV (ausência de atividade mitocondrial), TBARS (avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo), ESPMMCASA (número de espermatozóides ligados por mm^2 de membrana perivitelínica avaliado através do CASA) ESPMMMICRO (número de espermatozóides ligados por mm^2 de membrana perivitelínica avaliado através da microscopia convencional).

Em relação às variáveis avaliadas pelo CASA, os animais tratados com PUFA apresentaram espermatozóides com menor velocidade de percurso (VAP) que os outros grupos (controle: 67,07 ± 3,99^{a}; PUFA: 41,16 ± 7,42^{b}; vitamina E: 41,16 ± 7,42^{a}; PUFA + vitamina E: 61,05 ± 6,95 ^{a}; Tabela 6). Da mesma forma ocorreu para as variáveis velocidade retilínea (VSL; controle: 56,95 ± 2,85^{a}; PUFA: 35,08 ± 6,34^{b}; vitamina E: 55,21 ± 2,48^{a}; PUFA + vitamina E: 52,30 ± 6,13^{a}; Tabela 6) e velocidade curvilínea (VCL, controle: 111,03 ± 7,77^{a}, PUFA: 69,40 ± 12,33^{b}; vitamina E: 111,71 ± 5,34^{a}; PUFA + vitamina E: 100,90 ± 12,04^{a}; Tabela 6). Por outro lado, a motilidade espermática dos grupos tratados com vitamina E isoladamente ou em combinação com a suplementação com PUFA foi maior que a observada nos animais do grupo suplementado com PUFA isoladamente (controle: 12,50 ± 3,22^{ab}; PUFA: 5,77 ± 2,03^{b}; vitamina E: 20,36 ± 3,86^{a}; PUFA + vitamina E: 19,15 ± 6,50^{a}; Tabela 6). De maneira semelhante ocorreu para as variáveis motilidade progressiva (controle: 7,50 ± 2,24^{ab}; PUFA: 2,46 ± 1,09^{b}; vitamina E: 11,73 ± 3,05^{a}; PUFA + vitamina E: 10,69 ± 3,08 ^{a}; Tabela 6) e porcentagem de espermatozóides rápidos (controle: 8,67 ±

2,63[ab]; PUFA: 2,69 ± 1,13[b]; vitamina E: 14,18 ± 3,43[a]; PUFA + vitamina E: 12,46 ± 3,54 [a]; Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito do tratamento com Vitamina E, da suplementação com PUFA e da combinação PUFA+Vitamina E nas variáveis avaliadas pelo CASA em sêmen criopreservado de touros *Bos taurus* submetidos à insulação escrotal– São Paulo – 2013

	Controle	PUFA	Vitamina E	PUFA + Vitamina E
VAP	67.07 ± 3.99[a]	41.16 ± 7.42 [b]	68.14 ± 2.56 [a]	61.05 ± 6.95 [a]
VSL	56.95 ± 2.85 [a]	35.08 ± 6.34 [b]	55.21 ± 2.48 [a]	52.30 ± 6.13 [a]
VCL	111.03 ± 7.77 [a]	69.40 ± 12.33 [b]	111.71 ± 5.34 [a]	100.90 ± 12.04 [a]
MOTILE	12.50 ± 3.22 [ab]	5.77 ± 2.03 [b]	20.36 ± 3.86 [a]	19.15 ± 6.50 [a]
PROG	7.50 ± 2.24 [ab]	2.46 ± 1.09 [b]	11.73 ± 3.05 [a]	10.69 ± 3.08 [a]
RAPID	8.67 ± 2.63 [ab]	2.69 ± 1.13 [b]	14.18 ± 3.43 [a]	12.46 ± 3.54 [a]

[a,b]: Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos (linhas; p<0,05)
Variáveis: VAP (µm/s, Velocidade média de percurso),VSL(µm/s Velocidade retilínea), VCL (µm/s, velocidade curvilínea, MOTILE (%, motilidade total), PROG (%, motilidade progressiva), RAPID (%, espermatozóides com velocidade rápida).

6.2.2 Efeito do Tempo

Foi encontrada maior susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida 60 dias após a insulação (tempo 60) em comparação aos tempos 0, 1 e 45 (tempo 0: 30,89 ± 6,24[a]; tempo 1: 20,69 ± 3,66[a]; tempo 45: 25,09 ± 5,24[a]; tempo 60: 91,24 ± 0,75[b]; Tabela 7). Foi possível observar menor porcentagem de acrossomos íntegros nos tempos 45 e 60 (tempo 0: 65,45 ± 6,68[a]; tempo 1: 66,31 ± 4,02[a]; tempo 45: 46,31 ± 3,80[b]; tempo 60: 41,09 ± 4,48[b]; Tabela 7). Foi também encontrada menor porcentagem de espermatozóides com alta atividade mitocondrial (DAB I) nos tempos 45 e 60 (tempo 0: 63,67[a] ± 6,13; tempo 1: 52,57 ± 5,26[ab]; tempo 45: 48,85 ± 3,99[b]; tempo 60: 38,36 ± 4,41[b]; Tabela 7) e maior porcentagem de espermatozóides com média atividade mitocondrial (DABII) no tempo 60 (tempo 0: 15,60 ± 2,82[a]; tempo 1: 21,64 ± 1,73[a]; tempo 45: 17,69 ± 2,53[a]; tempo 60: 30,09 ± 3,70[b]; Tabela 7). As amostras apresentaram uma menor susceptibilidade ao estresse oxidativo nos tempos 45 e 60 (tempo 0: 1798,20 ± 282,33[a]; tempo 1: 1805,33 ± 250,56[a]; tempo 45: 1176,93 ± 118,23[b]; tempo 60: 1089,56 ± 108,69[b]; Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito do tempo (0, 1, 45 e 60 dias) sobre a avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros *Bos taurus* submetidos à insulação escrotal e tratados ou não com Vitamina E e PUFA – São Paulo – 2013

	Tempos (dias)			
	0	**1**	**45**	**60**
SCSA	30.89 ± 6.24 [a]	20.69 ± 3.66 [a]	25.09 ± 5.24 [a]	91.24 ± 0.75 [b]
INTEGRO	37.73 ± 6.97	40.46 ± 5.72	35.54 ± 3.28	37.73 ± 4.15
ACRO	65.45 ± 6.68 [a]	66.31 ± 4.02 [a]	46.31 ± 3.80 [b]	41.09 ± 4.48 [b]
DABI	63.67 ± 6.13 [a]	52.57 ± 5.26 [ab]	48.85 ± 3.99 [b]	38.36 ± 4.41 [b]
DABII	15.60 ± 2.82 [a]	21.64 ± 1.73 [a]	17.69 ± 2.53 [a]	30.09 ± 3.70 [b]
DABIII	3.50 ± 0.60	6.21 ± 1.77	6.77 ± 1.18	6.36 ± 0.65
DABIV	22.20 ± 7.76	19.50 ± 4.35	26.85 ± 4.60	25.27 ± 5.22
TBARS	1798 ± 282[a]	1805 ± 250 [a]	1176 ± 118 [b]	1089 ± 108 [b]
ESPMMCASA	46.39 ± 12.98	36.07 ± 22.63	21.23 ± 5.42	16.39 ± 4.88
ESPMMMICRO	25.01 ± 14.49	21.29 ± 10.96	17.77 ± 8.20	15.46 ± 6.33

[a,b]: Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos (linhas; p<0,05)

Testes funcionais: SCSA (avaliação da susceptibilidade da cromatina a denaturação ácida), ÍNTEGRO (integridade de membrana plasmática), ACRO (integridade acrossomal), DAB I (alta atividade mitocondrial), DAB II (média atividade mitocondrial), DAB III (baixa atividade mitocondrial), DAB IV (ausência de atividade mitocondrial), TBARS (avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo), ESPMMCASA (número de espermatozóides ligados por mm^2 de membrana perivitelínica avaliado através do CASA) ESPMMMICRO (número de espermatozóides ligados por mm^2 de membrana perivitelínica avaliado através da microscopia convencional).

Não foi observado efeito significante do tempo sobre as variáveis avaliadas pelo CASA (Tabela 8).

Tabela 8 - Efeito do tempo (0, 1, 45 e 60 dias) sobre as variáveis avaliadas pelo CASA em sêmen criopreservado de touros *Bos taurus* submetidos à insulação escrotal e tratados ou não com Vitamina E e PUFA – São Paulo – 2013

	Tempos (dias)			
	0	**1**	**45**	**60**
VAP	53.53 ± 8.68	57.66 ± 5.63	62.75 ± 4.30	61.01 ± 8.15
VSL	45.79 ± 7.46	48.97 ± 4.66	53.23 ± 3.20	49.57 ± 7.20
VCL	90.53 ± 15.04	91.90 ± 8.80	103.25 ± 8.24	104.57 ± 13.72
MOTILE	16.18 ± 6.10	17.64 ± 5.34	12.00 ± 3.05	10.64 ± 2.69
PROG	9.36 ± 2.91	11.00 ± 3.51	6.38 ± 1.50	4.55 ± 1.24
RAPID	10.09 ± 2.94	12.57 ± 4.00	8.23 ± 2.32	5.73 ± 1.65

[a,b]: Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos (linhas; p<0,05)

Variáveis: VAP (µm/s, Velocidade média de percurso),VSL(µm/s Velocidade retilínea), VCL (µm/s, velocidade curvilínea), MOTILE (%, motilidade total), PROG (%, motilidade progressiva), RAPID (%, espermatozóides com velocidade rápida).

6.3 CORRELAÇÕES

As análises de correlação foram obtidas dos grupos antes da insulação (Tempo 0) e imediatamente pós insulação (Tempo 1). Foram também avaliados os grupos tratados separadamente (PUFA, Vitamina E e PUFA + Vitamina E) agrupando-se os tempos 45 e 60.

No tempo 0 foi encontrada uma alta correlação entre o número de espermatozoides ligados avaliados pelo CASA e o número de espermatozoides ligados avaliados pelo microscópio (0,71509, p=0,0201). A ligação espermática avaliada pela microscopia convencional apresentou correlação positiva tanto com a motilidade total (0.84129, p=0.0023) quanto com a motilidade progressiva (0.64642, p= 0.0434). Por outro lado, a ligação espermática avaliada pelo CASA apresentou uma tendência a se correlacionar negativamente com a baixa atividade mitocondrial (DAB III; -0.57058,p=0.085). Por outro lado, em relação às velocidades espermáticas, houve uma correlação positiva entre a ligação espermática e a porcentagem de espermatozoides com velocidade média em ambos os métodos utilizados (CASA- 0,61291, p 0,045; micro 0,94375, p= <0.0001). Além disso, a ligação espermática avaliada pelo microscópio correlacionou-se negativamente com a porcentagem de espermatozoides estáticos. Já em relação à susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida (SCSA), houve uma correlação negativa com a susceptibilidade ao estresse oxidativo (TBARS; -0.83563, p 0.0014). Por outro lado, a integridade de acrossomo se correlacionou negativamente com a baixa atividade mitocondrial (DAB III; -0,80333,p= 0,0051) e ausência de atividade mitocondrial (DAB IV; -0,69538,p= 0,0256), além de ter uma tendência de se correlacionar positivamente com a alta atividade mitocondrial (DAB I; 0,59436; p=0.0914).

No tempo 1 a ligação espermática avaliada pelo CASA e pelo microscópio mostraram uma tendência a se correlacionar positivamente entre si (0,61787, p=0.0762). Além disso, a ligação espermática avaliada pelo CASA se correlacionou positivamente com as variáveis avaliadas pelo CASA VSL (0,72435, p=0.0273) e VCL (0.68101, p=0.0434), além de possuir uma tendência a se correlacionar positivamente com VAP (0.65674, p= 0.0547). Já a ligação espermática avaliada pelo microscópio apresentou uma correlação positiva com as variáveis do CASA VAP (0,83676;p=0,0049), VSL (0,72435; p= 0,0273) e VCL (0,68101; p= 0,0434).

Além disso, este método apresentou uma tendência de se correlacionar positivamente com o ALH (0,63569,p=0.0658). Em relação aos espermatozoides com integridade de membrana (íntegros), houve uma tendência a uma correlação positiva com a ligação espermática avaliada pelo microscópio (0,58854; p= 0,0955). Além disso, a integridade de membrana se correlacionou positivamente com motilidade (0,91773; p= 0,0005), motilidade progressiva (0,88778; p= 0,0014), alta atividade mitocondrial (DAB I; 0,76076; p=0.0173) e negativamente com baixa atividade mitocondrial (DAB III; -0,66738; p=0,0495).

Na avaliação das variáveis avaliadas dos animais suplementados com PUFA sem o tratamento de vitamina E, houve uma correlação entre a avaliação da ligação espermática avaliada pelo CASA e pelo microscópio (0,85724; p=0,0007). Além disso, esses dois métodos de avaliação se correlacionaram positivamente com motilidade (CASA- 0,82775; p=0,0017; microscópio- 0,90186; p= 0,0001), motilidade progressiva (CASA- 0,77696; p= 0,0049; microscópio- 0,85171; p= 0,0009), porcentagem de espermatozoides com velocidade rápida (CASA- 0,77918; p= 0,0047; microscópio- 0,81412; p= 0,0023) e média (CASA- 0,68791; p= 0,0047; microscópio- 0,79441; p= 0,0035). Por outro lado, a ligação espermática avaliada pelo CASA apresentou uma tendência em se correlacionar positivamente com integridade de membrana (0.54151, p= 0.0854), alta atividade mitocondrial (DAB I; 0,56726, p= 0,0688), ALH (0,55177; p= 0,0785) e correlacionou-se negativamente com a porcentagem de espermatozoides estáticos (-0,66252; p= 0,0263). Além disto, a integridade de membrana correlacionou-se positivamente com motilidade e alta atividade mitocondrial (DAB I; 0,68174; p= 0,0209). Por outro lado correlacionou-se negativamente com baixa (DAB III; -0,6127; p= 0,0451) e ausência de atividade mitocondrial (DAB VI; -0,63192; p= 0.037). Houve também, nesse mesmo tratamento, uma correlação positiva entre alta atividade mitocondrial e porcentagem de espermatozoides rápidos DAB I; 0,63347; p= 0,0364) e uma correlação negativa entre baixa atividade mitocondrial (DAB III) e motilidade(-0,61014; p= 0,0462) , BCF (-0,62374; p= 0,0403), STR (-0,63399; p= 0,0362) e LIN (-0,6093; p= 0,0462).

Nas amostras seminais do grupo de animais tratados com vitamina E, mas não suplementados com PUFA (Tabela 27) houve uma correlação positiva entre o número de espermatozoides ligados avaliados pelo CASA e pelo microscópio (0,89148; p= 0,0029). Além disso, ambos os métodos de avaliação apresentaram uma certa tendência a correlacionarem-se positivamente com a integridade

acrossomal (CASA – 0,71759; p= 0,0694; microscópio – 0,6816; p= 0,0917). A ligação espermática avaliada pelo CASA apresentou uma correlação positiva com a susceptibilidade ao estresse oxidativo (0,72158; p= 0,0433). Além disto, a susceptibilidade da cromatina à denaturação demonstrou ter uma tendência a correlacionar-se negativamente com a susceptibilidade ao estresse oxidativo (-0,63438; p= 0,0911). A alta atividade mitocondrial (DAB I) se correlacionou positivamente com motilidade total (0,92424; p= 0,001), motilidade progressiva (0,95652; p= 0,0002) e espermatozóides rápidos (0,94335; p= 0,0004).

Nas variáveis avaliadas de amostras seminais dos grupos tratados com vitamina E e suplementados com PUFA houve uma correlação positiva entre o número de espermatozóides ligados avaliados mensurados pelo CASA e pelo microscópio (0,8172; p= 0,0039). E ambos os métodos de avaliação correlacionaram negativamente com ALH (CASA -0,67014; p= 0,034; microscópio- -0,65539; p= 0,0397). Além disto, observou-se uma tendência de correlação positiva entre a integridade de membrana e integridade acrossomal (0.62026, p= 0.0557). Além disto, houve também uma tendência a uma correlação entre integridade de membrana e alta atividade mitocondrial (DABI; 0,60492; p= 0,0639). Por outro lado, a integridade acrossomal correlacionou-se positivamente com alta atividade mitocondrial (DABI; 0,68843; p= 0,0277).

6.4 DISCUSSÃO

Diversos estudos vêm sendo realizados para prevenir o estresse oxidativo no sêmen de touros *Bos taurus* em regiões tropicais (BILODEAU et al., 2001a; NICHI, 2009; BARNABE et al., 2012). Estudos sugerem que a suplementação com PUFAs melhora a qualidade espermática; porém uma maior quantidade de PUFA no sêmen tornaria os espermatozoides ainda mais susceptíveis ao estresse oxidativo (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004; BRINSKO et al., 2005; NICHI, 2009). A vitamina E, por sua conformação lipídica, promove um efeito protetor contra o ataque das espécies reativas de oxigênio à membrana espermática, principalmente no que diz respeito à sua bicamada lipídica (HATAMOTO, 2004). Além disto, esta vitamina atua pela quebra da reação em cadeia de formação das EROs (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).Desta forma a vitamina E pode ser considerado o antioxidante de eleição para evitar a maior susceptibilidade ao estresse oxidativo provocada por uma suplementação com PUFA (SIES, 1993). Assim, no presente estudo, foi realizada uma associação entre a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados na dieta e o tratamento com vitamina E injetável em touros *Bos taurus* submetidos à insulação testicular visando melhorar a qualidade espermática através do efeito dos PUFAs e prevenir o estresse oxidativo com a utilização da vitamina E.

Os testículos de touros devem ser mantidos de 4 a 5°C abaixo da temperatura corpórea para que seu funcionamento seja adequado A insulação testicular, por promover um aumento nessa temperatura, é um modelo interessante para estudar os mecanismos fisiopatológicos do efeito do estresse térmico testicular sobre a produção e qualidade espermática (BRITO et al., 2003). De fato, no presente estudo, a insulação escrotal dos animais que não foram submetidos aos tratamentos causou um aumento na fragmentação de DNA, mas apenas 60 dias após a insulação. Este efeito pode ser extremamente deletério para o futuro do espermatozoide, tornando a fragmentação irreparável e incompatível com o desenvolvimento embrionário e fetal normal. De fato estudos indicam que quando a célula espermática possui uma baixa fragmentação de DNA, o oócito assim como o embrião possuem mecanismos para corrigir essa fragmentação, dando origem a um indivíduo normal (WYROBEK et al., 2006; GASCA et al.,

2007). Por outro lado, para espermatozoides com alta fragmentação de DNA, esses mecanismos podem não ser suficientes, podendo levar à morte embrionária ou aborto ou ainda aumentar a probabilidade de doenças congênitas e problemas em gerações futuras (TESARIK; GRECO; MENDOZA, 2004; MARCHETTI; WYROBEK, 2005). No espermatozoide, os principais mecanismos que podem levar aos danos de DNA espermático são a apoptose durante a espermatogênese, as quebras nas fitas de DNA durante o remodelamento da cromatina na espermiogênese, a fragmentação causada por caspases e endonucleases endógenas e o estresse oxidativo durante o trânsito epididimário (SAKKAS; ALVAREZ, 2010). Estudos indicam que, dentre estes mecanismos, o estresse oxidativo pós-testicular seria a maior fonte de fragmentação de DNA (SAKKAS; ALVAREZ, 2010). No entanto, no presente estudo, uma maior fragmentação foi observada apenas 60 dias após a insulação, e não nos primeiros momentos após o desafio. Este resultado sugere que os mecanismos relacionados aos danos no DNA espermático pelo estresse térmico testicular agudo podem estar mais relacionados a problemas durante a espermatogênese (e.g., apoptose, quebras de fitas durante a espermiogênese e a fragmentação causada por caspases e endonucleases).

De maneira semelhante, maiores porcentagens de espermatozoides com acrossomos lesionados e atividade mitocondrial prejudicada foram encontradas em ejaculados colhidos a partir dos 45 dias após a insulação, indicando também um efeito deletério durante a espermatogênese. Além disso, a correlação negativa entre fragmentação de DNA e a integridade acrossomal, assim como entre esta última e atividade mitocondrial após a insulação, podem indicar uma influência dos mecanismos de apoptose e do ataque de caspases e endonucleases sobre as organelas citoplasmáticas. Assim, visto que o acrossomo é uma estrutura formada a partir do Complexo de Golgi, durante a espermatogênese, uma possível ativação nos mecanismos de morte celular via mitocôndria durante este estágio poderia levar a alterações acrossomais na célula já madura.

De forma semelhante, foi observada correlação positiva entre integridade de membrana plasmática e espermatozoides apresentando alta atividade mitocondrial (DAB I) e negativa com aqueles com baixa atividade mitocondrial (DABIII). Tais resultados poderiam ser explicados por uma liberação de agentes

pró-oxidativos devido às lesões mitocondriais, sendo que esses agentes podem ser extremamente lesivos às estruturas espermáticas, incluindo a membrana plasmática (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999; WANG et al., 2003). Outra explicação plausível para essa correlação seria um aumento na apoptose abortiva, o que levaria a uma elevada presença de espermatozoides que deveriam ter sofrido a morte celular, mas que, por uma falha no processo, chegaram ao ejaculado . As alterações bioquímicas associadas a apoptose ocorrem na superfície da célula e no DNA durante a espermatogênese, sendo que a membrana plasmática do espermatozoide perde a sua simetria. Com isso, a Fosfatidilserina (PS), normalmente presente no folheto interno da membrana plasmática das células saudáveis, é translocada e exposta na monocamada externa (ANZAR et al., 2002). Além disso, a via mitocondrial é a principal via de apoptose espermática, pela qual lesões mitocondriais provocam uma liberação de agentes pró-apoptóticos que participam na ativação das caspases, enzimas essenciais para a apoptose espermática (BUSTAMANTE FILHO; SILVA; JOBIM, 2005).

O espermatozóide possui fisiologicamente uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados na membrana. As insaturações (ligações duplas entre carbonos) que caracterizam estes ácidos graxos, alteram sua conformação espacial, tornando a membrana mais desorganizada e, por conseguinte, mais fluida. Esta maior fluidez é fundamental e necessária aos processos fisiológicos como motilidade e fertilização (LEAT et al., 1983; LANGLAIS; ROBERTS, 1985; LADHA, 1998). No entanto, essas ligações duplas são mais facilmente oxidadas, e portanto, mais susceptíveis a peroxidação lipídica causada por um ataque de EROs (NICHI et al., 2007). Sendo assim, apesar de alguns estudos demonstrarem que a suplementação com PUFA promove uma melhoria na qualidade espermática (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004a; BRINSKO et al., 2005), esse tratamento, por outro lado, tornaria o espermatozoide ainda mais susceptível à peroxidação lipídica. Além disto, é importante ressaltar que alguns produtos dessa peroxidação, como o malondialdeído, podem ser extremamente lesivos à célula espermática levando a uma cascata de reações oxidativas (AITKEN, R. J.; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993b; AITKEN, R. JOHN et al., 2006).

Na avaliação do efeito da suplementação com PUFA isoladamente, verificou-se uma diminuição da porcentagem de células com membrana e acrossomo íntegros. Esse efeito foi observado provavelmente devido a um aumento no estresse oxidativo testicular causado pela insulação, que foi exacerbado pelo efeito dos PUFAs no aumento da susceptibilidade da membrana espermática ao estresse oxidativo (AITKEN, R. JOHN et al., 2006; NICHI, 2009). Apesar de uma menor susceptibilidade ao estresse oxidativo (TBARS induzido) neste grupo, foi possível observar, no sêmen fresco, um maior estresse oxidativo espontâneo nas amostras seminais dos animais suplementados com PUFA quando comparado aos animais que sem a suplementação (PUFA – 221,50 ± 75,45, controle 63,87 ± 17,7; dados não apresentados), Possivelmente, a técnica de indução, por submeter as células à níveis extremos de estresse oxidativo, pode ter mascarado o estresse oxidativo que realmente ocorreu em determinada amostra, como demonstrado nas amostras pré-criopreservação.

Nas amostras seminais deste mesmo grupo foi observada uma correlação positiva entre alta atividade mitocondrial (DABI) e susceptibilidade ao estresse oxidativo. Uma possível explicação para essa correlação seria que as mitocôndrias com alta atividade, quando lesionadas, liberariam uma maior quantidade de agentes pró-oxidativos que poderiam exacerbar o estresse oxidativo. Além disso, foi possível observar uma correlação positiva entre o número de espermatozoides ligados por mm^2 de membrana perivitelínica e as variáveis motilidade, motilidade progressiva, espermatozoides com velocidade rápida e média, o que não foi observado nas amostras do grupo controle. Possivelmente, o estresse maior provocado pela presença de uma maior quantidade de substrato oxidável, exacerbou alguns efeitos deletérios levando a uma maior variabilidade de resultados e tornando mais claras correlações entre variáveis de fato relacionadas.

De fato um trabalho realizado por Aitken et al (AITKEN, R. JOHN et al., 2006), demonstra que uma alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados em uma situação de estresse oxidativo irá levar à peroxidação lipídidica que pode ser uma das causas de infertilidade masculina. Portanto, a suplementação com PUFAs deve ser criteriosa, sendo que, idealmente, deve ser utilizada na ausência de estresse oxidativo ou associada a um antioxidante para prevenir o possível efeito deletério desta suplementação.

A vitamina E é considerada um antioxidante chave na prevenção do estresse oxidativo, agindo através da interceptação das EROs, quebrando a reação de formação dos radicais livres resultando em produtos não radicais, ou seja, sem elétrons despareados na última camada eletrônica (SIES, 1993). Além disso, por ser solúvel em lipídeos, este antioxidante protege os ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana contra a peroxidação lipídica (BRADFORD et al., 2003a). De fato, alguns trabalhos indicam que o tratamento com vitamina E, promove um efeito protetor contra a peroxidação lipídica causada pelas EROs (BREININGER et al., 2005; HATAMOTO et al., 2006; BARNABE et al., 2012). Realmente no presente estudo foram encontradas maiores porcentagem de células com membrana e acrossomo íntegros nos animais tratados com vitamina E quando comparados aos grupos suplementados com PUFA. Além disto, as amostras dos animais tratados com Vitamina E apresentaram uma maior motilidade, motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos em relação às amostras colhidas do grupo suplementado com PUFA. Além disto, apesar de não significante, houve um aumento nestas mesmas variáveis em comparação ao grupo controle. Estes resultados reforçam a hipótese de que a vitamina E promoveu um efeito protetor contra o estresse oxidativo causado pela insulação escrotal principalmente no que diz respeito à membrana plasmática, sendo que esta proteção pode ter ocorrido já durante o trânsito do espermatozoide pelo epidídimo, onde a motilidade espermática é adquirida (HOSKINS; BRANDT; ACOTT, 1978).

Outro resultado bastante interessante foi a correlação positiva encontrada entre a motilidade, a motilidade progressiva e a porcentagem de espermatozóides rápidos e a porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial. Apesar de alguns estudos recentes indicarem que a glicólise, para algumas espécies, parece ser o principal mecanismo de produção de ATP para a motilidade espermática (MUKAI; OKUNO, 2004; FORD, 2006; NASCIMENTO et al., 2008). No caso deste animais em que o estresse oxidativo foi inibido pela vitamina E, a atividade mitocondrial foi essencial à motilidade espermática (KOPPERS et al., 2008). Além disto, pudemos observar uma alta correlação positiva entre o número de espermatozoides ligados à membrana perivitelínica e a susceptibilidade ao estresse oxidativo avaliada pelo subproduto da peroxidação lipídica. Isto poderia indicar um efeito fisiológicos das EROs

sobre a capacidade fecundante dos espermatozoides (DE LAMIRANDE, E et al., 1997) em uma ambiente e que o estressse oxidativo estaria inibido pelo tratamento com Vitamina E (SIES, 1993).

Se por um lado, o aumento da produção de EROS ou a diminuição da capacidade antioxidantes se torna um evento oxidativo extremamente deletério ao sêmen, quando essas EROs estão em equilíbrio em relação a atividade antioxidante, estas são essenciais para alguns eventos fisiológicos necessários para os processos de fertilização como hiperativação (DE LAMIRANDE; CAGNON, 1993), capacitação (AITKEN et al., 2004), reação acrossomal (GRIVEAU; RENARD; LANNOU, 1995; DE LAMIRANDE et al., 1998) e interação entre oócito e zona pelúcida (AITKEN, et al., 1995). Estes eventos fisiológicos ocorrem principalmente pela ação do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, espécies reativas de oxigênio que antecedem a formação do radical hidroxila. Esta ERO, por ser extremamente instável (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), induz efeitos deletérios significantes à diversos sistemas biológicos Assim, através da ação primordial da vitamina E, impedindo o efeito deletério do radical hidroxila, o aumento nos níveis deste antioxidante permitiria a ação fisiológica das EROS primárias (e.g., ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico) sem que o sistema seja influenciado negativamente pelo instável radical hidroxila.

A eficiência de um tratamento antioxidante depende de uma série de fatores. É necessário, por exemplo, que o sistema alvo esteja sob a ação de uma quantidade de EROS suficiente para sobrepujar a capacidade dos mecanismos antioxidantes deste sistema (HALLIWELL, BARRY, 1985; NICHI, 2009). Além disso, o estudo da dose adequada deste antioxidante é fundamental, visto que uma concentração abaixo da quantidade ideal não irá fazer efeito; por outro lado, uma concentração excessiva poderá inibir os efeitos fisiológico destas EROs (DE LAMIRANDE et al., 1997; NICHI, 2009). Outro fator importante seria a escolha do antioxidante específico para a ERO que está causando danos à célula espermática, já que cada antioxidante possui predileção por um determinado agente pró-oxidativo (BARROS, 2007). A associação de tratamentos entre a vitamina E e ácidos graxos poli-insaturados visou melhorar a qualidade espermática devido ao efeito benéfico das PUFAs, sendo que o efeito deletério no aumento da susceptibilidade à peroxidação

lipídica seria inibido pelo uso da vitamina E. No presente estudo, os tratamentos isolados com PUFA e vitamina E apresentaram os resultados esperados. Se por um lado, a suplementação com PUFA mostrou-se deletéria ao sêmen possivelmente por um aumento na susceptibilidade espermática ao estresse oxidativo exacerbado pela insulação testicular, a vitamina E reduziu a susceptibilidade do sêmen a este estresse. Por outro lado, a associação entre estes tratamentos não foi eficiente na melhoria da qualidade espermática, sendo que, de maneira similar ao ocorrido no grupo controle, 60 dias após o início do tratamento, houve um aumento na fragmentação de DNA assim como um aumento de lesões acrossomais. Em concordância a esses resultados, um trabalho realizado por Castellini et al. (2003) o tratamento com vitamina E associado com PUFA em coelhos não promoveu uma melhora na qualidade espermática, sendo que houve um aumento na produção de EROS com a utilização destes tratamentos, indicando que a Vitamina E talvez não seja o antioxidante ideal para o estresse oxidativo adicional provocado pela maior quantidade de PUFA. De fato, neste mesmo estudo, quando foi realizada uma associação entre PUFA e vitamina C houve uma redução na produção de EROs. Isso provavelmente ocorreu visto que a vitamina C tem a capacidade de destruir diversas EROs (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila) (GROPPER; SMITH; GROFF, 2009), em contraste à vitamina E que previne a ação principalmente do radical hidroxila sobre os lipídios de membrana (NAVARRETE et al., 2005).

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Comprovando em parte nossa hipótese, o tratamento com vitamina E apresentou efeitos benéficos para algumas características espermáticas em touros *Bos taurus* submetidos a insulação testicular, sendo o contrário observado pelo tratamento com PUFAS. No entanto, a associação entre estes tratamentos não foi eficiente para a melhora na qualidade espermática e na capacidade fecundante avaliada através do teste de ligação espermática em membrana perivitelínica de ovos de galinha, sendo que foi possível padronizá-lo para sêmen criopreservado de touros.

Referências

REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 1, p. 69-75, 2006.

AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; CARRERAS, A.; IRVINE, D. S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 4, p. 495-504, 1996.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Mol Reprod Dev**, v. 35, n. 3, p. 302-315, 1993a.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, n. 3, p. 302-315, 1993b.

AITKEN, R. J.; WEST, K.; BUCKINGHAM, D. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. **J Androl**, v. 15, n. 4, p. 343-352, 1994.

AITKEN, R. J.; PATERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D. W.; VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 5, p. 2017-2025, 1995.

AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; CARRERAS, A.; IRVINE, D. S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radic Biol Med**, v. 21, n. 4, p. 495-504, 1996.

AITKEN, R. J.; RYAN, A. L.; BAKER, M. A.; MCLAUGHLIN, E. A. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 8, p. 994-1010, 2004.

AITKEN, R. J.; WINGATE, J. K.; DE IULIIS, G. N.; KOPPERS, A. J.; MCLAUGHLIN, E. A. Cis-Unsaturated Fatty Acids Stimulate Reactive Oxygen Species Generation and Lipid Peroxidation in Human Spermatozoa. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 4154-4163, 2006.

AITKEN, R. J. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 1, p. 69-75, 2006.

AITKEN, R. J.; WINGATE, J. K.; DE IULIIS, G. N.; MCLAUGHLIN, E. A. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 203-211, 2007.

ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **J Androl**, v. 8, n. 5, p. 338-348, 1987.

AMANN, R.; PICKETT, B. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of equine veterinary science**, v. 7, n., p., 1987.

AMANN, R. P.; SHABANOWITZ, R. B.; HUSZAR, G.; BRODER, S. J. In vitro sperm-binding assay to distinguish differences in populations of human sperm or damage to sperm resulting from cryopreservation. **J Androl**, v. 20, n. 5, p. 648-654, 1999.

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M. M.; KROETSCH, T. G.; PAULS, K. P. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 2, p. 354-360, 2002.

ARTHUR, P. F.; HEARNSHAW, H.; STEPHENSON, P. D. Direct and maternal additive and heterosis effects from crossing Bos indicus and Bos taurus cattle: cow and calf performance in two environments. **Livestock Production Science**, v. 57, n. 3, p. 231-241, 1999.

ASBIA. (Associação Brasileira de Inseminação Artificial) Relatório de comercialização de sêmen, 2011. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>. Acesso em 10 de outubro de 2012., v., n., p., 2011.

BARBATO, G. F.; CRAMER, P. G.; HAMMERSTEDT, R. H. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 3, p. 686-699, 1998.

BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; GOES, P.; PEREZ, E. G. A.; LOSANO, J. D. A.; ROCHA, C. C.; DALMAZZO, A.; TSUNODA, R. H.; RODRIGUES, M. P.; PACHECO FILHO, P. I.; LEZCANO, F. A.; NICHI, M. 242 PROTECTIVE EFFECT OF VITAMIN E TREATMENT IN HEAT-STRESSED BOS TAURUS BULLS. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 1, p. 269-269, 2012.

BARRATT, C. L.; TOMLINSON, M. J.; COOKE, I. D. Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. **Fertility and Sterility**, v. 60, n. 3, p. 520-525, 1993.

BARROS, P. M. H. **. Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (Leopardus tigrinus, SCHREBER, 1775)**. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São PauloSão Paulo, 2007.

BARTH, A.; OKO, R. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**: Iowa State University Press, 1989

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Can Vet J**, v. 35, n. 2, p. 93-102, 1994.

BAUSEK, N.; WACLAWEK, M.; SCHNEIDER, W. J.; WOHLRAB, F. The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. **J Biol Chem**, v. 275, n. 37, p. 28866-28872, 2000.

BECONI, M. T.; AFFRANCHINO, M. A.; SCHANG, L. M.; BEORLEGUI, N. B. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochem Int**, v. 23, n. 3, p. 545-553, 1991.

BEEFPOINT. Homenagem a pecuária e pecuaristas brasileiros, 2012. Disponível em < http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/giro-do-boi/minerva-foods-lanca-video-homenageando-a-pecuaria-e-pecuaristas-brasileiros/> Acesso em : 20 de novembro de 2012., v., n., p., 2012.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Mol Reprod Dev**, v. 55, n. 3, p. 282-288, 2000.

BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M. A. Thiols prevent H2O2-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 275-286, 2001.

BONDE, J. P. E.; ERNST, E.; JENSEN, T. K.; HJOLLUND, N. H. I.; KOLSTAD, H.; SCHEIKE, T.; GIWERCMAN, A.; SKAKKEBÆK, N. E.; HENRIKSEN, T. B.; OLSEN, J. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. **The Lancet**, v. 352, n. 9135, p. 1172-1177, 1998.

BRADFORD, A.; ATKINSON, J.; FULLER, N.; RAND, R. P. The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 10, p. 1940-1945, 2003b.

BREININGER, E.; BEORLEGUI, N. B.; O'FLAHERTY, C. M.; BECONI, M. T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2126-2135, 2005.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; BLANCHARD, T. L.; DAY, B. C.; WILSON, M. E. Effect of feeding a DHA-enriched nutriceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1519-1527, 2005.

BRITO, L. F.; SILVA, A. E.; BARBOSA, R. T.; UNANIAN, M. M.; KASTELIC, J. P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 1, p. 1-16, 2003.

BURKMAN, L. J.; CODDINGTON, C. C.; FRANKEN, D. R.; KRUGEN, T. F.; ROSENWAKS, Z.; HOGEN, G. D. The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 4, p. 688-697, 1988.

BURRELLO, N.; CALOGERO, A. E.; PERDICHIZZI, A.; SALMERI, M.; D'AGATA, R.; VICARI, E. Inhibition of oocyte fertilization by assisted reproductive techniques and increased sperm DNA fragmentation in the presence of Candida albicans: a case report. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 8, n. 5, p. 569-573, 2004.

BUSTAMANTE FILHO, I. C.; SILVA, J. F. S.; JOBIM, M. I. M. Apoptose em espermatozóides: uma nova abordagem na avaliação da viabilidade espermática. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 3, p. 395-404, 2005.

CARTWRIGHT, T. C. Responses of Beef Cattle to High Ambient Temperatures. **Journal of Animal Science**, v. 14, n. 2, p. 350-362, 1955.

CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; BOSCO, A. D.; MINELLI, A.; MUGNAI, C. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 43, n. 1, p. 91-103, 2003.

CHAUDIERE, J.; WILHELMSEN, E. C.; TAPPEL, A. L. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. **The Journal of biological chemistry**, v. 259, n. 2, p. 1043-1050, 1984.

CORCINI, C. D.; SILVA, B. E. D.; BRIZOLARA, R. M. R.; GHELLER, S. M. M.; VARELA JUNIOR, A. S.; BONGALHARDOI, D. C.; LUCIA JUNIOR, T. Concentração de lactato de cálcio e tempo de incubação sobre a capacidade de adesão e penetração de espermatozoides suínos na membrana perivitelina do ovo da galinha. v., n., p., 2012.

COX, J. F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 860-867, 2006.

CRISCUOLO, T., ROCHA, A.M., SEMACO, T., SERZEDELO, T., ALEGRETTI, J.R., SERAFINI, P., MOTTA, E.L.A. Motile sperm binding to the egg yolk membrane is an easy and feasible function test for acrosome integrity. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, v. 14, n. 4, p. 4, 2010.

DE ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C.; ANDRADE, A.; GARCIA, A.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.; SOUZA, L. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. v., n., p., 2005.

DE LAMIRANDE, E.; CAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, n. 2, p. 157-166, 1993.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 48-54, 1997.

DE LAMIRANDE, E. V. E.; TSAI, C.; HARAKAT, A.; GAGNON, C. Involvement of Reactive Oxygen Species in Human Sperm Arcosome Reaction Induced by A23187, Lysophosphatidylcholine, and Biological Fluid Ultrafiltrates. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 5, p. 585-594, 1998.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 3, p. 484-495, 1999.

EVENSON, D.; WIXON, R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, n. 4, p. 466-472, 2006.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; DE ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

FERNANDEZ, J. L.; MURIEL, L.; RIVERO, M. T.; GOYANES, V.; VAZQUEZ, R.; ALVAREZ, J. G. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. **J Androl**, v. 24, n. 1, p. 59-66, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n., p. 61-68, 1997.

FIELDS, M. J.; BURNS, W. C.; WARNICK, A. C. Age, Season and Breed Effects on Testicular Volume and Semen Traits in Young Beef Bulls. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 1299-1304, 1979.

FORD, W. C. L. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 3, p. 269-274, 2006.

FRAGA, C. G.; MOTCHNIK, P. A.; SHIGENAGA, M. K.; HELBOCK, H. J.; JACOB, R. A.; AMES, B. N. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 24, p. 11003-11006, 1991.

GABALDI, S. H.; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciência Agrária e Saúde, Andradina**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 2002.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1–4, p. 371-379, 1996.

GASCA, S.; PELLESTOR, F.; ASSOU, S.; LOUP, V.; ANAHORY, T.; DECHAUD, H.; DE VOS, J.; HAMAMAH, S. Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 14, n. 2, p. 175-183, 2007.

GOMEZ; IRVINE; AITKEN. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, p. 81-94, 1998.

GOOVAERTS, I. G. F.; HOFLACK, G. G.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; DE KRUIF, A.; BOLS, P. E. J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 323-330, 2006.

GORCZYCA, W.; GONG, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Detection of DNA Strand Breaks in Individual Apoptotic Cells by the in Situ Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and Nick Translation Assays. **Cancer Research**, v. 53, n. 8, p. 1945-1951, 1993.

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, n. 1, p. 55-64, 1990.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; MILLER, M. G.; BERGER, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function☆. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 5-10, 2000.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; BAUMBER, J.; BALL, B. A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1691-1703, 2000.

GRIVEAU, J. F.; RENARD, P.; LANNOU, D. L. Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process. **International Journal of Andrology**, v. 18, n. 2, p. 67-74, 1995.

GRIVEAU, J. F.; LANNOU, D. L. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v. 20, n. 2, p. 61-69, 1997.

GROPPER, S. A. S.; SMITH, J. L.; GROFF, J. L. **Advanced Nutrition and Human Metabolism**: Wadsworth Cengage Learning, 2009

HALLIWELL, B. **Free radicals in biology and medicine / Barry Halliwell and John M.C. Gutteridge**. Oxford : New York :: Clarendon Press ; Oxford University Press, 1985

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73, 1990.

HARRIS, J. D.; HIBLER, D. W.; FONTENOT, G. K.; HSU, K. T.; YUREWICZ, E. C.; SACCO, A. G. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. **DNA Seq**, v. 4, n. 6, p. 361-393, 1994.

HATAMOTO, L. K. **Efeito do estresse e da suplementação com vitamina E sobre parâmetros seminais, peroxidação lipídica de componentes seminais e atividade das enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal de cães.** Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo2004.

HATAMOTO, L. K.; BAPTISTA SOBRINHO, C. A.; NICHI, M.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1610-1614, 2006.

HINSCH, K. D.; HINSCH, E. The zona pellucida 'receptors' ZP1, ZP2 and ZP3. **Andrologia**, v. 31, n. 5, p. 320-322, 1999.

HIRANO, Y.; SHIBAHARA, H.; OBARA, H.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, S.; YAMAGUCHI, C.; TSUNODA, H.; SATO, I. ANDROLOGY: Relationships Between Sperm Motility Characteristics Assessed by the Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) and Fertilization Rates In Vitro. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 18, n. 4, p. 215-220, 2001.

HOCHACHKA, P. W.; LUTZ, P. L. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals☆. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 130, n. 4, p. 435-459, 2001.

HOSKINS, D.; BRANDT, H.; ACOTT, T. Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. In: Federation proceedings, 1978, p. 2534.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

HUGHES, C. M.; LEWIS, S. E. M.; MCKELVEY-MARTIN, V. J.; THOMPSON, W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, n. 8, p. 613-619, 1996.

IBGE. **(Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Produção da pecuária municipal, 2010. Disponível em : <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/default.shtm>**: secondary title, 2010. Acesso em 10 de outubro de 2012.

IRVINE, D. S.; MACLEOD, I. C.; TEMPLETON, A. A.; MASTERTON, A.; TAYLOR, A. Andrology: A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. **Human Reproduction**, v. 9, n. 12, p. 2324-2334, 1994.

JEULIN, C.; SOUFIR, J. C.; WEBER, P.; LAVAL-MARTIN, D.; CALVAYRAC, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. **Gamete Res**, v. 24, n. 2, p. 185-196, 1989.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

JOW, W. W.; SCHLEGEL, P. N.; CICHON, Z.; PHILLIPS, D.; GOLDSTEIN, M.; BARDIN, C. W. Identification and localization of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development. **J Androl**, v. 14, n. 6, p. 439-447, 1993.

JÓŹWIK, M.; JÓŹWIK, M.; KUCZYŃSKI, W.; SZAMATOWICZ, M. Nonenzymatic antioxidant activity of human seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v. 68, n. 1, p. 154-157, 1997.

KAMIGUCHI, Y.; MIKAMO, K. An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. **American journal of human genetics**, v. 38, n. 5, p. 724, 1986.

KOGER, M. Effective crossbreeding systems utilizing Zebu cattle. **Journal of Animal Science**, v. 50, n. 6, p. 1215-1220, 1980.

KOPPERS, A. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; MCLAUGHLIN, E. A.; AITKEN, R. J. Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3199-3207, 2008.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free radical biology & medicine**, v. 26, n. 3-4, p. 463-471, 1999.

LADHA, S. Lipid Heterogeneity and Membrane Fluidity in a Highly Polarized Cell, the Mammalian Spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v. 165, n. 1, p. 1-10, 1998.

LANGLAIS, J.; ROBERTS, K. D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete Research**, v. 12, n. 2, p. 183-224, 1985.

LASLEY, B. L.; LOSKUTOFF, N. M.; ANDERSON, G. B. The limitation of conventional breeding programs and the need and promise of assisted reproduction in nondomestic species. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 119-132, 1994.

LEAT, W. M. F.; NORTHROP, C. A.; HARRISON, F. A.; COX, R. W. EFFECT OF DIETARY LINOLEIC AND LINOLENIC ACIDS ON TESTICULAR DEVELOPMENT IN THE RAT. **Experimental Physiology**, v. 68, n. 2, p. 221-231, 1983.

LOSANO, J. D. A. N., M. ; PEREZ, E. G. A. ; GOES, P. ; ROCHA, C. C. ; TSUNODA, R. H. ; DALMAZZO, A. ; RODRIGUES, M. P. ; PACHECO FILHO, P. I. ; LEZCANO, F. A. ; BARNABE, V. H. ; BARNABE, R. C. **Oxidative status in heat stressed Bos taurus bulls submitted to polyunsaturated fatty acids oral supplementation**: secondary title. Campinas - SP: IV Internacional Symposium on Animal Biology of Reproduction (ISABR 2012), 2012. v.9**,** 1032-1032 p.

MANICARDI, G. C.; BIANCHI, P. G.; PANTANO, S.; AZZONI, P.; BIZZARO, D.; BIANCHI, U.; SAKKAS, D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 4, p. 864-867, 1995.

MANN, K. Proteomic analysis of the chicken egg vitelline membrane. **Proteomics**, v. 8, n. 11, p. 2322-2332, 2008.

MAPA. (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Bovinos e Bubalinos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em 20 de novembro de 2012., v., n., p., 2012.

MARCHETTI, F.; WYROBEK, A. J. Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 75, n. 2, p. 112-129, 2005.

MATES, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 1-3, p. 83-104, 2000.

MOLINA, R.; BOLAÑOS, I.; GALINA, C. S.; PÉREZ, E.; PANIAGUA, G.; ESTRADA, S. Sexual behaviour of Zebu bulls in the humid tropics of Costa Rica: single versus multiple-sire groups. **Animal Reproduction Science**, v. 64, n. 3–4, p. 139-148, 2000.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis Plays a Major Role for Adenosine Triphosphate Supplementation in Mouse Sperm Flagellar Movement. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 540-547, 2004.

NASCIMENTO, J. M.; SHI, L. Z.; TAM, J.; CHANDSAWANGBHUWANA, C.; DURRANT, B.; BOTVINICK, E. L.; BERNS, M. W. 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**, v. 217, n. 3, p. 745-751, 2008.

NAVARRETE, M.; RANGEL, C.; CORCHADO, J. C.; ESPINOSA-GARCIA, J. Trapping of the OH radical by alpha-tocopherol: a theoretical study. **J Phys Chem A**, v. 109, n. 21, p. 4777-4784, 2005.

NEDELJKOVIC, Z. S.; GOKCE, N.; LOSCALZO, J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. **Postgrad Med J**, v. 79, n. 930, p. 195-199; quiz 198-200, 2003.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS.**, Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Seasonal variation in semen quality in Bos indicus and Bos taurus bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822-828, 2006a.

NICHI, M.; BOLS, P. E.; ZUGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. Seasonal variation in semen quality in Bos indicus and Bos taurus bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822-828, 2006b.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G.; CORTADA, C. N.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B.; BOLS, P. E. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007.

NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poliinsaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Tese (Doutorado em Reprodução Animal). , São Paulo, 2009.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

O'FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, n. 5, p. 269-275, 1997.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P. D.; ANDRADE, A. F. C. D.; CELEGHINI, E. C. C.; REEB, P. D.; MARTINS, J. P. N.; SANTOS, R. M. D.; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; MONTEIRO, F. M.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science**, v. 137, n. 3, p. 145-155, 2013.

OLLERO, M.; GIL-GUZMAN, E.; LOPEZ, M. C.; SHARMA, R. K.; AGARWAL, A.; LARSON, K.; EVENSON, D.; THOMAS, A. J., JR.; ALVAREZ, J. G. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. **Hum Reprod**, v. 16, n. 9, p. 1912-1921, 2001.

PARKINSON, T. Seasonal variations in semen quality of bulls: correlations with environmental temperature. **Veterinary Record**, v. 120, n. 20, p. 479-482, 1987.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.

PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P. T. K. A Single, Mild, Transient Scrotal Heat Stress Causes Hypoxia and Oxidative Stress in Mouse Testes, Which Induces Germ Cell Death. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 5, p. 913-919, 2009.

PELLICER, A.; OLIVEIRA, N.; RUIZ, A.; REMOHÍ, J.; SIMÓN, C. Exploring the mechanism(s) of endometriosis-related infertility: an analysis of embryo development and implantation in assisted reproduction. **Human Reproduction**, v. 10, n. suppl 2, p. 91-97, 1995.

PETERSON, R. N.; SILVERSTEIN, K.; FREUND, M. A RAPID FLUOROMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF DNA IN HUMAN SEMEN. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n. 2, p. 485-488, 1974.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v., n., p. 87-95, 1991.

RESTLE, J.; PASCOAL, L. L.; FATURI, C.; ALVES FILHO, D. C.; BRONDANI, I. L.; PACHECO, P. S.; PEIXOTO, L. Efeito do grupo genético e da heterose nas características quantitativas da carcaça de vacas de descarte terminadas em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 350-362, 2002.

REYES, J. G.; FARIAS, J. G.; HENR; #XED; QUEZ-OLAVARRIETA, S.; #XE1; MADRID, E.; PARRAGA, M.; ZEPEDA, A. B.; MORENO, R. D. The Hypoxic Testicle: Physiology and Pathophysiology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, n., p. 15, 2012.

RIBEIRO, D.; PESSOA, M. M. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). v., n., p.

ROBERTSON, L.; BROWN, H. L.; STAINES, H. J.; WISHART, G. J. Characterization and application of an avian in vitro spermatozoa–egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, n. 2, p. 205-211, 1997.

RONOT, X.; BENEL, L.; ADOLPHE, M.; MOUNOLOU, J. C. Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry. **Biology of the Cell**, v. 57, n. 1, p. 1-7, 1986.

ROSO, V. M.; FRIES, L. A. Avaliação das heteroses materna e individual sobre o ganho de peso do nascimento ao desmame em bovinos Angus x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 732-737, 2000.

SAKKAS, D.; ALVAREZ, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 4, p. 1027-1036, 2010.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A.; NADA, E. A.; EL-TONSY, M. H.; SHARMA, R. K.; MEYER, A.; NELSON, D. R.; THOMAS JR, A. J. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. supplement 3, p. 1597-1605, 2003.

SHIBAHARA, H.; OBARA, H.; AYUSTAWATI; HIRANO, Y.; SUZUKI, T.; OHNO, A.; TAKAMIZAWA, S.; SUZUKI, M. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. **International Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 63-68, 2004.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SKINNER, J. D.; LOUW, G. N. Heat stress and spermatogenesis in Bos indicus and Bos taurus cattle. **Journal of Applied Physiology**, v. 21, n. 6, p. 1784-1790, 1966.

ST. JOHN, J. C. The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 109-123, 2002.

TESARIK, J.; GRECO, E.; MENDOZA, C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. **Human Reproduction**, v. 19, n. 3, p. 611-615, 2004.

TRAVIS, A. J.; FOSTER, J. A.; ROSENBAUM, N. A.; VISCONTI, P. E.; GERTON, G. L.; KOPF, G. S.; MOSS, S. B. 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, n. 2, p. 263-276, 1998.

TURNER, J. W. Genetic and biological aspects of Zebu adaptability. **Journal of Animal Science**, v. 50, n. 6, p. 1201-1205, 1980.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, n. 1–2, p. 31-39, 2004a.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

WACLAWEK, M.; FOISNER, R.; NIMPF, J.; SCHNEIDER, W. J. The Chicken Homologue of Zona Pellucida Protein-3 Is Synthesized by Granulosa Cells. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1230-1239, 1998.

WANG, X.; SHARMA, R. K.; GUPTA, A.; GEORGE, V.; THOMAS JR, A. J.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. **Fertility and Sterility**, v. 80, Supplement 2, n. 0, p. 844-850, 2003.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim Reprod Sci**, v. 60-61, n., p. 481-492, 2000.

WAYNE, R. P. **Chemistry of atmospheres**, 1985. Medium: X; Size: Pages: 355 p. (Other Information: From review by James C.G. Walker, Geochimica et Cosmochimica Acta, Vol. 50, No. 7, Page 1567(July 1986))

WILLHAM, R. L. Genetic Consequences of Crossbreeding. **Journal of Animal Science**, v. 30, n. 5, p. 690-693, 1970.

WYROBEK, A. J.; ESKENAZI, B.; YOUNG, S.; ARNHEIM, N.; TIEMANN-BOEGE, I.; JABS, E. W.; GLASER, R. L.; PEARSON, F. S.; EVENSON, D. Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 25, p. 9601-9606, 2006.

YANAGIMACHI, R. Zona-free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. **Gamete Research**, v. 10, n. 2, p. 187-232, 1984.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, v. 55, n. 6, p. 922-926, 2000.