UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

RENATA LANÇONI

**Uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da
função do espermatozoide equino criopreservado**

Pirassununga
2015

RENATA LANÇONI

**Uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da função
do espermatozoide equino criopreservado**

Pirassununga

2015

RENATA LANÇONI

**Uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da função do
espermatozoide equino criopreservado**

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. Rubens Paes de Arruda

De acordo: _____

Orientador(a)

Pirassununga

2015

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.3129
FMVZ

Lançoni, Renata

Uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da função do espermatozoide equino criopreservado / Renata Lançoni. -- 2015.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Estresse oxidativo. 2. Antioxidantes. 3. Criopreservação. 4. Sondas fluorescentes. 5. Garanhão. I. Título.

São Paulo, 17 de abril de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da função do espermatozoide equino criopreservado.", protocolado sob o CEUA nº 6982031014, utilizando 4 Equídeos (4 machos), sob a responsabilidade de Rubens Paes De Arruda, foi aprovado na reunião de 15/10/2014, e 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.

We certify that the Research "Use of melatonin and ferulic acid as promoters function of cryopreserved equine spermatozoa.", protocol number CEUA 6982031014, utilizing 4 Equines (4 males), under the responsibility Rubens Paes De Arruda, was approved in the meeting of day 10/15/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LANÇONI, Renata

Título: Uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da função do espermatozoide equino criopreservado

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: _____

Ao meu pai, **Santo Durvalino Lançoni**, por ser meu maior exemplo. Por ser tão atencioso, preocupado e sempre me ajudar a encontrar as melhores soluções para tudo. Por possuir esse infinito bom humor que alegra nossos dias.

A minha mãe, **Laide Sertório**, por uma vida inteira de dedicação e por ser sempre o ombro que eu posso recorrer em qualquer situação.

Sem o esforço de vocês nada disso seria possível. Serei eternamente grata pela criação que nos deram.

Aos meus irmãos **Fabio Augusto Lançoni** e **Ana Claudia Lançoni**. Apesar da palavra “irmão” já possuir um significado forte, vocês conseguem ser bem mais do que isso. Obrigada pela amizade.

Vocês são minha maior preciosidade. Dedico este trabalho a vocês, assim como dedico a minha vida inteira. Tudo o que faço é para vocês, por vocês e pensando em vocês.

Com muito amor, dedico.

Agradecimentos

À Deus, por me permitir viver tudo isso.

Ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda por ter me aceitado como orientada e seguir na orientação durante esses dois anos. Obrigada por se dedicar tanto e passar tão bem as técnicas, cobrar os estudos e a responsabilidade. Ensinando também, princípios, educação, comportamentos, tentando dessa maneira formar profissionais completos. Desde que cheguei aqui, sempre me deu muita atenção e demonstrou muita preocupação em ensinar a maneira correta de tudo e assim se seguiu até o fim desta dissertação. Muito obrigada por todo o tempo dedicado a mim. Isso fez muita diferença. Depois de parar para refletir sobre esses dois anos, sei que o melhor caminho que poderia ter seguido depois da graduação foi ter vindo para cá, a rotina que vivi aqui e todos os trabalhos que realizamos me acrescentou muito e eu lhe devo tudo isso. O Sr. está no lugar certo, sendo professor, espero que mantenha esta vontade de passar conhecimento por muito tempo.

À minha família inteira, incluindo meus pais, meus irmãos, meu sobrinho, minha Vó, tios, tias e primos por terem me apoiado em todas as decisões tomadas até aqui e me receberem sempre com muito carinho nos fins de semana livre, era a melhor maneira de revigorar. Em especial, gostaria de agradecer os meus Tios Zé e Tidi por terem me demonstrado e me inserido na vida no campo desde criança, iniciando meu contato com os cavalos, por me mostrarem que era disso que eu mais gostava e assim, ter escolhido a medicina veterinária. Com vocês aprendi muito mais do que em muitas aulas.

Ao Samuel, por ter sido a pessoa que mais me acompanhou de perto na conclusão desse trabalho. Obrigada pela companhia, tornando meus dias muito melhores e por ser sempre tão paciente, possuindo e transmitindo calma, me dando suporte e fazendo o possível e o impossível para me ajudar. Você é essencial, muito obrigada por tudo.

À Prof. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini por estar sempre tão disposta a ajudar, obrigada por todas as perguntas respondidas e todas as dúvidas tiradas. A convivência com a Sra. é muito agradável, uma ótima pessoa e ótima profissional. Obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade por gentilmente ter cedido seu laboratório e vários dias de trabalho nele para que pudéssemos realizar as análises. Muito

obrigada também ao grupo de pesquisa comandado pelo Prof. André pela ajuda em administrar o calendário do laboratório.

Ao Prof. Dr. Marcílio Nichi por ter cedido o seu conhecimento para nos ajudar no protocolo de indução do estresse oxidativo no protocolo da sonda fluorescente CellRox. Obrigada pela ajuda.

À Maíra por ter sido meu braço direito nos procedimentos desse experimento, por ter me acompanhado desde o início, vindo aqui todos os dias, inclusive nos fins de semana. Obrigada pela dedicação e por ter se tornado essa grande amiga, fazendo os dias de trabalho no laboratório serem muito mais leves.

À todas as pessoas que ajudaram ativamente e intensamente na realização deste experimento, incluindo pós-graduandos e estagiários, Gabriel, Shirley, Sandra, Luciana, Patrícia, Sara. Obrigada pelo esforço de vocês.

Ao Kleber por ter auxiliado na estatística com tanta presteza e me apresentar os dados com tamanha organização, facilitando a inclusão dos resultados no trabalho.

À todos os estagiários que passaram pelo LBSA neste período, trazendo muitas contribuições.

Aos amigos feitos aqui em Pirassununga, no VRA, que me permitiram agradáveis companhias e momentos de lazer, tornando a rotina aqui ainda mais agradável.

À todos os Professores do VRA, muito obrigada pelas conversas e disciplinas oferecidas.

Aos meus professores da graduação Aauto, Cabral e Maria Alessandra por terem se tornado grandes amigos e não medirem esforços para passar os ensinamentos. Obrigada por todos os conselhos. Eu levo vocês no meu coração.

À Guta e ao Danilo, obrigada pelo tempo na fazenda e pela ajuda. Foram meses de muito proveito e resultaram em uma grande amizade.

Ao Clayton e à Harumi pela grande ajuda em toda a parte burocrática, a experiência de vocês nos auxilia muito. Obrigada pela dedicação.

Aos funcionários do VRA e do Setor de Equideocultura, Marcio, João, Seu Zé, Quel e Roberley, a ajuda de vocês foi imprescindível, muito obrigada pelo trabalho com os garanhões.

À Elza Faquim pelo auxílio na formatação e pela prontidão em tirar nossas dúvidas.

À empresa Botupharma por ter cedido todos os diluidores necessários para esta pesquisa.

À CAPES por ter financiado este projeto de pesquisa.

Aos cavalos participantes deste experimento, muito obrigada pela paciência com todos nós.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana”.

(Carl Gustav Jung)

RESUMO

LANÇONI, R. **Uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da função do espermatozoide equino criopreservado.** [Use of melatonin and ferulic acid as promoters of cryopreserved equine sperm]. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser responsáveis por causar danos às membranas dos espermatozoides, fragmentação de DNA, entre outros fatores, influenciando assim na fertilidade principalmente no processo de criopreservação do sêmen. A melatonina (MEL) e o ácido ferúlico (AF) são potentes agentes antioxidantes que poderiam atuar no controle da produção de ROS no sêmen equino. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos antioxidantes AF e MEL na criopreservação do sêmen equino. Foram utilizados 5 ejaculados de 4 garanhões. Dentre os tratamentos aplicados, foram utilizadas duas concentrações de cada antioxidante (AF 0,5mM, AF 1,2mM, MEL 2mM e MEL 1µM) além do controle (diluidor de congelamento convencional BotuCrio®), totalizando 5 tratamentos. As variáveis analisadas foram cinética espermática pelo sistema CASA (programa SCA - Sperm Class Analyser), morfologia, integridade de membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, com o uso das sondas fluorescentes PI, Hoescht 33342, FITC-PSA e JC-1 além da produção de (ROS) pelo espermatozoide com a sonda fluorescente CellRox Deep Red®. Comparações entre os tratamentos foram realizadas pelo modelo linear generalizado (PROC GLM) do SAS (Versão 9.3) e as diferenças entre eles foram localizadas através do teste de Duncan. A probabilidade de $P \leq 0,05$ foi considerada como diferença significativa. Os resultados para características da motilidade tiveram diferença significativa em alguns aspectos, porém nenhum tratamento foi superior ao controle. Houve diminuição no percentual de defeitos maiores nas amostras tratadas com AF 1,2mM, MEL 2mM e MEL 1µM comparadas ao grupo controle. No que diz respeito à integridade de membranas, o tratamento MEL 1µM apresentou porcentagens significativamente melhores nas células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial, quando comparadas ao grupo controle. As células em estresse oxidativo não se diferenciaram entre os tratamentos. O uso da sonda fluorescente CellRox Deep Red® foi validado para

espermatozoides de equinos. Foram utilizados 4 ejaculados de 4 garanhões aos quais eram submetidos aos tratamentos T0 (fração do ejaculado não submetida à indução do estresse oxidativo), T50 (50% da amostra não induzida e 50% induzida ao estresse oxidativo) e T100 (amostra induzida ao estresse oxidativo). Os dados de porcentagem de células positivas (com estresse oxidativo) foram submetidos à análise de regressão polinomial pelo modelo linear generalizado (PROC GLM) do SAS (Versão 9.3). O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,88 e a probabilidade de $P \leq 0,05$ foi considerada significativa. Pode-se concluir que o tratamento MEL 1 μ M contribui para a preservação da integridade de membranas espermáticas durante o processo de criopreservação do sêmen equino e que a sonda fluorescente CellRox Deep Red[®] é eficiente na detecção de espécies reativas de oxigênio no espermatozoide de garanhões.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Antioxidantes. Criopreservação. Sondas fluorescentes. Garanhão.

ABSTRACT

LANÇONI, R. **Use of melatonin and ferulic acid as promoters of cryopreserved equine sperm.** [Uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da função do espermatozoide equino criopreservado]. 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Reactive oxygen species (ROS) can be responsible for causing damage to the membranes of sperm, DNA fragmentation, among other factors influencing fertility especially in cryopreservation. Melatonin (MEL) and ferulic acid (FA) are potent antioxidants that could act in the control of ROS production in equine semen. This study aimed to evaluate the effect of antioxidants AF and MEL in cryopreservation of equine semen. Five ejaculates from four stallions were used. Among the treatments, we used two concentrations of each antioxidant (AF 0.5mM, AF 1.2mM, MEL 2 mM and MEL 1 μ M) beyond the control (conventional freezing extender BotuCrio®), totaling five treatments. The parameters analyzed were sperm kinetics with the CASA system (SCA program - Sperm Class Analyzer), morphology, plasma and acrossomal membrane integrity mitochondrial membrane potential, using fluorescent probes PI, Hoechst 33342, FITC-PSA and JC- 1 over production ROS by the sperm with the fluorescent probe CellRox Deep Red®. Comparisons between treatments were performed by generalized linear model (PROC GLM) of SAS (version 9.3) and the differences between them were located with the Duncan test. The probability of $P \leq 0.05$ was considered significant. The results for the motility characteristics were significant differences in some aspects, but no treatment was superior to the control. There was a decrease in the percentage of major defects in the samples treated with AF 1.2mM, MEL 2 mM and MEL 1 μ M compared to the control group. Regarding to membrane integrity, treatment MEL 1 μ M showed significantly better in percentages of cells with intact plasma membrane, intact acrosome and high mitochondrial membrane potential compared to the control group. Cells with oxidative stress not differ between treatments. The fluorescent probe CellRox Deep Red® was validated for equine sperm previously. Was used ejaculates of 4 stallion which were subjected to the treatments T0 (fraction of the ejaculate not subjected to induction of oxidative stress), T50 (50% sample uninduced and 50% induced to oxidative stress) and T100

(sample induced to oxidative stress). The data of percentage of positive cells (with oxidative stress) were submitted to polynomial regression analysis based on generalized linear model (GLM PROC) of SAS (version 9.3). The value of the coefficient of determination (R^2) was 0.88 and a probability of $P \leq 0.05$ was considered significant. It can be conclude that the treatment MEL 1 μ M contributes to the preservation of the integrity of sperm membranes during the equine sperm cryopreservation process and the fluorescent probe CellRox Deep Red[®] is efficient in the detection of reactive oxygen species in stallions sperm.

Keywords: Oxidative stress. Antioxidants. Cryopreservation. Fluorescent probes. Stallion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Espermatozoides equinos corados com as sondas fluorescentes CellRox Deep Red® e Hoescht 33342	42
Gráfico 1 – Gráfico de Regressão Polinomial para a porcentagem de células positivas ao estresse oxidativo em função dos tratamentos (0, 50 e 100), avaliadas pela sonda fluorescente CellRox em ejaculados de garanhões	43
Gráfico 2 - Médias ($\pm$ E.P.M.) das características de morfologia em espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos	58
Gráfico 3 - Médias ($\pm$ E.P.M.) das características espermáticas de integridade de membranas plasmática, acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial avaliadas por sondas fluorescentes em espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos	59
Gráfico 4 - Médias ($\pm$ E.P.M.) da produção de ROS pela sonda fluorescente CellRox em espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos	60
Quadro 1 - Classificação das células de acordo com a integridade de membranas plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial, detectadas pelas sondas PI, FITC-PSA e JC-1, respectivamente	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias ($\pm$ E.P.M.) das características de motilidade (CASA-SCA) em espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos	57
Tabela 2 - Médias ($\pm$ E.P.M.) das características morfológicas em espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
AF	ácido ferúlico
AI	membrana acrossomal íntegra
ALH	amplitude lateral de cabeça
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
APM	alto potencial de membrana mitocondrial
ATP	adenosina trifosfato
BCF	frequência de batimento
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
CONT	Controle
DCFH-DA	2',7'- diacetato de diclorofluoresceína
DGA	cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa
DNA	ácido desoxirribonucleico
Fe	ferro
FITC	isotiocianato de fluoresceína
<i>g</i>	força centrífuga
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GPP	gota protoplasmática proximal
H ⁺	íon hidrogênio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
H33342	Hoechst 33342
Hz	Hertz
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'- tetracloro- 1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
LIN	Linearidade
MEL	melatonina
mM	Milimolar
mL	Mililitro
MP	motilidade progressiva
MPI	membrana plasmática intacta

MT	motilidade total
O_2^-	ânion superóxido
$OH^\cdot$	radical hidroxila
P	Probabilidade
PI	iodeto de propídeo
PIAIA	membrana plasmática intacto, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial
PROC	Procedimento
R^2	coeficiente de determinação
RAP	células rápidas
ROS	espécies reativas de oxigênio
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
STR	Retilinearidade
TALP	meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato
VAP	velocidade média do trajeto
VCL	velocidade curvilínea
VSL	velocidade progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
/	por
<	Menor
>	maior
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual
®	marca registrada
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO NA FUNÇÃO ESPERMÁTICA.....	25
2.2	INFLUÊNCIA DO ESTRESSE OXIDATIVO NA FUNÇÃO ESPERMÁTICA E CRIOPRESERVAÇÃO	29
2.3	MELATONINA	32
2.4	ÁCIDO FERÚLICO	34
3	VALIDAÇÃO DO USO DA SONDA FLUORESCENTE CELLROX DEEP RED PARA DETECTAR ESTRESSE OXIDATIVO EM ESPERMATOZOIDES EQUINOS	37
3.1	INTRODUÇÃO.....	37
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.2.1	Local	39
3.2.2	Animais	39
3.2.3	Colheita do sêmen	39
3.2.4	Procedimentos laboratoriais	40
3.2.5	Preparo da amostra para análise de ROS	41
3.2.6	Avaliação do estresse oxidativo	41
3.2.7	Análise estatística	42
3.3	RESULTADOS	43
3.4	DISCUSSÃO	43
3.5	CONCLUSÃO.....	45
4	USO DA MELATONINA E DO ÁCIDO FERÚLICO COMO PROMOTORES DA FUNÇÃO DO ESPERMATOZOIDE EQUINO CRIOPRESERVADO	47
4.1	INTRODUÇÃO.....	47
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
4.2.1	Local.....	49
4.2.2	Animais	49
4.2.3	Colheita do sêmen	50
4.2.4	Procedimentos laboratoriais pré-congelação	50
4.2.5	Tratamentos experimentais	51
4.2.6	Criopreservação do sêmen	51

4.2.7	Análises do sêmen pós-descongelção	52
4.2.8	Análise estatística	55
4.3	RESULTADOS	56
4.3.1	Características da motilidade espermática	56
4.3.2	Características morfológicas	57
4.3.3	Integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial	59
4.3.4	Produção de ROS	60
4.4	DISCUSSÃO	60
4.5	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO GERAL

As taxas de prenhez em equinos são muito variáveis, indo de 35 a 90% e tendem a ser significativamente menor do que em outras espécies domésticas (MORRIS; ALLEN, 2002). A primeira prenhez com sêmen congelado de garanhão foi descrita em 1975 por Barker e Gandier, no qual os espermatozoides foram recuperados do epidídimo e congelados com diluidor a base de leite desnatado e 10% de glicerol. Sete éguas foram inseminadas e apenas uma concebeu o potro. Ao comparar as taxas de prenhez dessa época com as de hoje, pode-se concluir que a técnica passou por uma evolução, porém, estagnou e ainda há muitas possibilidades de pesquisas.

A criopreservação de sêmen equino tem sido aceita na equinocultura por possibilitar a venda do potencial genético do garanhão para qualquer lugar do mundo, permitir o armazenamento do sêmen até o momento ideal para a inseminação da égua em estro, preservar os gametas masculinos durante anos para uso em futuras gerações, aumentar a relação égua/garanhão e impedir transmissão de doenças. Além disso, a criopreservação impede potenciais injúrias que podem ser causadas aos garanhões, éguas e potros e os grandes custos que pode-se resultar disso.

O ponto negativo de se utilizar sêmen criopreservado é que as taxas de concepção ainda são menores quando comparadas com monta natural, sêmen *in natura* diluído ou refrigerado (BRADFORD; BUHR, 2002). Há muitas variáveis que influenciam nos resultados dessas taxas, como dose inseminante, momento da inseminação e local da deposição do sêmen. Outra limitação do sêmen congelado equino é devido a alta variabilidade entre garanhões e entre ejaculados de um mesmo garanhão com relação a capacidade espermática de sobreviver à criopreservação (AMANN; PICKETT, 1987; VIDAMENT et al., 1997).

Para que a técnica possa apresentar melhores resultados na espécie equina, é necessário um estudo mais amplo sobre os vários aspectos relacionados à fisiologia do espermatozoide, aos processos de criopreservação e à melhoria dos testes aplicados para analisar as células espermáticas submetidas a congelação e descongelação, uma vez que os danos ocasionados pela criopreservação afetam as

funções celulares, resultando em redução da fertilidade (ARRUDA, 2000). Tais lesões são devido aos procedimentos envolvidos, como a centrifugação, as diferenças de pH e osmolaridade e as quedas de temperatura que o sêmen será exposto.

Devido a tais fatores, muitos estudos são conduzidos com o intuito de melhorar as taxas de prenhez com a utilização do sêmen criopreservado equino, com diferentes diluidores, curvas de refrigeração e congelação, momentos de inseminação, adição de antioxidantes, entre outros (HEITLAND et al., 1996; TRIMECHE et al., 1999; BAUMBER et al., 2000; FAYER-HOSKEN; CHRISTIAN, 2014).

Aitken e colaboradores afirmaram, em 2012, que uma das descobertas mais importantes dos últimos anos é que um dos maiores causadores dos danos da função espermática é o estresse oxidativo.

As espécies reativas de oxigênio possuem grande importância no processo de criopreservação, pois podem ser responsáveis por causar danos às membranas dos espermatozoides, fragmentação de DNA, entre outros fatores, influenciando assim na fertilidade. Dessa forma, os antioxidantes escolhidos para este estudo foram a melatonina e o ácido ferúlico. A melatonina é um potente antioxidante anfifílico (hidro e lipossolúvel), o que a torna capaz de penetrar qualquer compartimento celular. O ácido ferúlico é um composto fenólico que exibe uma ampla gama de efeitos terapêuticos contra diversas doenças devido ao seu potente efeito antioxidante.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo a adição dos antioxidantes ácido ferúlico e melatonina ao processo de congelação do sêmen equino buscando uma melhoria nos padrões de motilidade espermática e na integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.

Esta dissertação está estruturada em três capítulos. No primeiro, será apresentada uma revisão de literatura sobre os temas abordados neste trabalho, justificando sua realização. O segundo capítulo será em formato de artigo científico, se referindo ao uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da função do espermatozoide equino criopreservado. Já o terceiro será referente à técnica de

validação da sonda fluorescente CellRox Deep Red[®] em espermatozoides equinos para detecção do estresse oxidativo.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão serão abordados os efeitos da criopreservação na função espermática, a influência do estresse oxidativo e a possibilidade de diminuir tais efeitos prejudiciais com a utilização de antioxidantes.

2.1 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO NA FUNÇÃO ESPERMÁTICA

Ao contrário dos machos de outras grandes espécies, os garanhões se tornam reprodutores, baseados principalmente no seu pedigree, performance, desempenho e conformação. Porém, pouca importância é dada à sua real capacidade reprodutiva. Provavelmente por esse motivo, a “indústria” do cavalo trabalha com reprodutores de fertilidade menor do que o considerado normal em outras espécies (VARNER; GIBB; AITKEN, 2014).

O espermatozoide pode parecer uma célula relativamente simples, com basicamente cabeça e cauda, tendo perdido a maioria das suas organelas durante a sua formação no testículo e maturação no epidídimo. Porém, ao invés de simples, é uma célula extremamente diferenciada e adaptada para concluir a fertilização, requerendo grande equilíbrio celular para coordenar suas funções e alta função molecular para obter sucesso nesta missão (VARNER; GIBB; AITKEN, 2014).

Muitos fatores devem ser considerados quando se tem a intenção de congelar sêmen de um garanhão, dentre eles a exposição do espermatozoide à refrigeração, os danos pela formação dos cristais de gelo e mudanças intracelulares causadas pela desidratação associada a formação de gelo durante a congelação (AMANN; PICKETT, 1987).

Dentre os vários tipos de estresse causados ao espermatozoide pela congelação, a centrifugação é um dos primeiros. Esse procedimento é utilizado para concentrar as células, podendo causar diminuição da porcentagem de espermatozoides móveis e aumentar a porcentagem de células com danos na membrana plasmática e acrossomal (AMANN; PICKETT, 1987). Porém, Blach et al.

(1988), fizeram um estudo sobre as mudanças no espermatozoide durante a congelação, analisando as partidas de 8 garanhões em 4 momentos: após a colheita, após a centrifugação, após 3 horas congelado e após a descongelação depois de 10 a 20 dias congelado. Assim, constataram que a maioria dos danos aos espermatozoides são resultantes da congelação e descongelação, enquanto a centrifugação causa os menores danos.

Os diluidores de criopreservação do espermatozoide equino possuem basicamente lipídeos, lipoproteínas, combinações entre gema de ovo e leite desnatado, glicerol, ou a combinação de um ou mais açúcares como crioprotetores. Outros componentes também podem ou não ser incluídos, como o EDTA, (ácido etilenodiaminotetracético), detergentes, tampões para pH e antibióticos (GRAHAM, 1996).

O glicerol é um agente crioprotetor muito utilizado. Porém, foi demonstrado que sua adição aos diluidores quando não se realizava o processo de congelação e descongelação, reduz a fertilidade, demonstrando que ele é importante na criopreservação mas não é benéfico ao espermatozoide *in natura* ou refrigerado. Sendo assim, a adição de glicerol aos diluidores de congelação para equinos contém, em sua maioria de 3 a 4% de glicerol, quantidade pequena quando comparado aos bovinos que possuem de 5 a 10% de glicerol na composição dos diluidores de congelação (AMANN; PICKETT, 1987).

Arruda (2000) testou vários diluidores de congelação para sêmen equino, utilizando EDTA-lactose-gema de ovo, INRA82 e leite desnatado, cada um desses associado a 5% de glicerol ou etilenoglicol. Os espermatozoides foram analisados quanto aos parâmetros de motilidade pelo sistema computadorizado (CASA) e integridade de membranas por sondas fluorescentes. O autor observou que os diluidores A1 (EDTA-lactose-gema de ovo com concentração final de 5% de glicerol), B1 (INRA82 com 5% de glicerol) e B2 (INRA 82 com 5% de etilenoglicol) tiveram melhores resultados para a congelação do sêmen equino.

Amann e Picket (1987) afirmaram que quando um espermatozoide é submetido a temperaturas abaixo de 0°C, iniciará a formação de cristais de gelo extracelulares. Isto resulta em um aumento da concentração de sais no fluido extracelular. Inicialmente, a água de dentro do espermatozoide não estará

congelada e migrará de dentro dele para o meio extracelular, desse modo o espermatozoide será progressivamente desidratado. Como a água não pode deixar a célula rapidamente, haverá a formação de cristais de gelo intracelular, que causarão danos ao espermatozoide, considerando que a formação de gelo extracelular é menos prejudicial à célula. Por outro lado, se a curva de congelação for muito lenta, a alta concentração de sais intracelulares causada pela desidratação, também causará danos. A melhor curva é a que busca um equilíbrio entre esses fatores.

Porém, Morris et al. (2007), utilizaram técnicas avançadas para tentar detectar estes cristais de gelo intracelulares, como microscopia eletrônica e medição de formação de gelo por calorimetria exploratória diferencial e constataram que tais cristais são esperados, mas não foram detectados experimentalmente. Obviamente há muitas outras mudanças na célula durante este procedimento, que contribuem ainda mais para os danos que são causados nos espermatozoides que são submetidos a essa biotecnologia. No referido trabalho, os autores atribuíram o dano osmótico como maior causador da perda de viabilidade do espermatozoide criopreservado (MORRIS et al., 2007). Estes danos são conjuntamente chamados de “choque frio”, que inclui uma série de mudanças no espermatozoide não completamente entendidas e parcialmente irreversíveis ocorrendo principalmente entre 20 e 1°C. Tais mudanças ocorrem devido ao rearranjo de lipídeos durante a congelação e descongelação, estes rearranjos podem permitir a passagem rápida de moléculas que normalmente passariam lentamente, e podem levar ao dano ou morte celular. O método de congelação utilizado na maioria dos protocolos equinos visa uma refrigeração e congelação lenta para evitar estes efeitos negativos, lembrando que, como já citado, se esta curva for muito lenta, a célula sofre uma desidratação excessiva que também é prejudicial (PEÑA et al., 2012).

Para entender como o choque frio danifica o espermatozoide, é necessário considerar a sua estrutura, tendo um núcleo extremamente condensado, correspondendo a apenas 5 a 10% do volume da cromatina de uma célula somática (VARNER; GIBB; AITKEN, 2014), suas fibras, microtúbulos e membranas. Os microtubulos e fibras são importantes para sua motilidade, pois constituem o axonema e a parte fibrosa da cauda, porém, quando consideramos o choque frio, estruturas membranosas tem maior importância. Nas membranas estão incluídas

plasmática, acrossomal interna e externa, nuclear e mitocondrial (AMANN; PICKETT, 1987).

A composição lipídica da membrana plasmática apresenta grande variação entre os mamíferos, contendo no geral, 70% de fosfolípidios, 25% de lípidios neutros e 5% de glicolípidios. Os fosfolípidios são subdivididos em fosfoglicerolipídeos e esfingomielina, sendo que entre os fosfoglicerolipídeos estão: fosfocolina, fosfoetanolamina, fosfatidilserina, cardiolipina, fosfatidilinositol. Os lípidios neutros incluem, em sua maior parte o colesterol, mas também desmosterol, sulfato de colesterol e éster colesteril. Dentre os glicolípidios encontrados no espermatozoide estão os seminolípidios e outros traços de glicolípidios (FLESCH; GADELLA, 2000).

As membranas espermáticas (plasmática, acrossomal e mitocondrial) são agregados de lípidios e proteínas adquiridos durante a espermatogênese, e modificados conforme o espermatozoide caminha pelo epidídimo, durante seu armazenamento e ejaculação. A função da membrana é determinada pela interação de seus vários componentes, por exemplo, as interações entre lípidios e proteínas que resultam em poros na membrana, enzimas e receptores. Qualquer processo que altere essas interações, também alterará sua função (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990).

Durante a descongelação, o espermatozoide é exposto a um meio hipotônico, que resulta no aumento de volume da célula durante o influxo de água para o citoplasma, que continua até que as concentrações de solutos estejam equilibradas no meio intra e extracelular. Sendo assim, a célula passa por dois estresses osmóticos, o hiperosmótico durante a congelação, seguido do hiposmótico durante a descongelação. Os danos à membrana são causados pelo aumento e diminuição bruscos da célula (PEÑA et al., 2011). Essas alterações nas membranas dos espermatozoides como consequência da criopreservação, inevitavelmente afetam sua função no trato genital da fêmea, como a ligação nas células epiteliais do oviduto, capacitação, reação acrossômica, ligação e penetração na zona pelúcida do oócito e devem ser levadas em consideração (GRACIELA et al., 2003).

2.2 INFLUÊNCIA DO ESTRESSE OXIDATIVO NA FUNÇÃO ESPERMÁTICA E CRIOPRESERVAÇÃO

O espermatozoide, como qualquer outra célula em condições aeróbicas, enfrenta constantemente o paradoxo do oxigênio, de que ele é essencial para a vida, porém, o metabolismo oxidativo das moléculas biológicas pode ser potencialmente tóxico pela formação de muitas espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem modificar as funções e a viabilidade celular (BAUMBER et al., 2000).

ROS são agentes oxidantes altamente reativos que pertencem à classe dos radicais livres. Os radicais livres podem ser definidos como qualquer átomo ou molécula (não necessariamente derivado do oxigênio) com um ou mais elétrons desapareados na sua órbita externa, dos quais são altamente instáveis. Dentre as ROS estão incluídas: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apesar de ser uma espécie reativa de oxigênio não se enquadra na classificação dos radicais livres, pois possuem um par de elétrons na sua órbita externa, ânion superóxido (O_2^-) e radical hidroxila ($OH^\cdot$) que são sintetizadas naturalmente como produto de organismos aeróbicos (SARASWAT; KHARCHE; JINDAL, 2014).

O estresse oxidativo é determinado pelo desbalanço entre a produção e a degradação das ROS em um tecido. Os espermatozoides e o plasma seminal possuem várias enzimas e antioxidantes (não enzimáticos) que degradam as ROS a fim de evitar o dano celular. Existem três principais sistemas enzimáticos que foram descritos no plasma seminal: sistema glutathione peroxidase/reductase, superóxido dismutase e catalase. Além disso, vários outros componentes do plasma seminal podem agir como antioxidantes tais como vitamina E, vitamina C, urato, albumina, taurina e hipotaurina. Os métodos de preparação dos espermatozoides relacionados com técnicas da reprodução envolvem a remoção do plasma seminal, retirando sua proteção antioxidante e aumentando a susceptibilidade ao estresse oxidativo (BAUMBER et al., 2000).

Existem dois sistemas envolvidos na produção de ROS no espermatozoide, um deles é o sistema NADPH oxidase, na membrana plasmática. O outro sistema é o NADH óxido-redutase dependente, em níveis mitocondriais (AITKEN; BAKER,

2004). O metabolismo mitocondrial é a principal fonte de ROS do espermatozoide (GIBB; LAMBOURNE; AITKEN, 2014).

Os espermatozoides de mamíferos no geral, possuem uma composição lipídica muito específica, com altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados. A estrutura incomum da membrana espermática é responsável pela flexibilidade e funcionalidade do espermatozoide. Devido a isso, a célula espermática é extremamente susceptível ao ataque de ROS (SARASWAT; KHARCHE; JINDAL, 2014). Além disso, diferente da maioria das células somáticas, que possuem um abundante espaço citoplasmático para armazenar suas propriedades antioxidantes, os espermatozoides possuem pouquíssimo citoplasma, se limitando basicamente na sua peça intermediária (AITKEN; LAMBOURNE; GIBB, 2014).

Devido a peroxidação, a membrana plasmática do espermatozoide perde sua fluidez e, conseqüentemente, sua integridade e funcionalidade. Além disso, as ROS são capazes de atacar o DNA e as mitocôndrias, levando a perda de potencial de membrana mitocondrial, resultando também na perda de motilidade espermática. A indução de geração de ROS pelas mitocôndrias é o primeiro passo para ativação de mecanismos internos que levarão a cascata de apoptose, que é associada com a indução de várias mudanças que previnem o espermatozoide de participar do processo de fertilização (AITKEN et al., 2012).

Os produtos finais da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), inibem grande número de enzimas celulares, como ATPase, que podem afetar o movimento do espermatozoide. Conseqüentemente, as ROS prejudicam o movimento espermático, principalmente pela inibição ou alteração de uma ou mais enzimas envolvidas no metabolismo espermático (SARASWAT; KHARCHE; JINDAL, 2014).

Uma das conseqüências da peroxidação lipídica é a estimulação de uma maior produção de ROS, assim, estes dois fatores estão intimamente relacionados e dependentes, sendo que qualquer fator que estimule um deles irá gerar maior produção de radicais livres pela mitocôndria e, conseqüentemente, ampliará ainda mais a peroxidação lipídica, causando nos espermatozoides um ciclo de auto propagação (AITKEN; LAMBOURNE; GIBB, 2014).

Durante o metabolismo celular, as ROS são instáveis e extremamente reativas, se tornando estáveis se adquirirem elétrons de ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas, carboidratos ou de qualquer molécula que estiver próxima, causando uma cascata de reações em cadeia que irão causar dano celular. Dentre as ROS, o ânion superóxido é gerado constantemente por vários processos celulares, sendo o principal deles, a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, em condições fisiológicas normais (SARASWAT; KHARCHE; JINDAL, 2014).

Como os elétrons passam do complexo I ao complexo IV na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, ocorre o “vazamento” contínuo de elétrons e a formação do ânion superóxido. É estimado que cerca de 2% do oxigênio consumido é transformado em ânion superóxido, que por sua vez, é convertido em H_2O_2 por dismutação espontânea ou pela superóxido dismutase na matriz mitocondrial (BALAO DA SILVA et al., 2011). O peróxido de hidrogênio, produto do metabolismo dos espermatozoides, tem um efeito supressivo no consumo de oxigênio e na motilidade (AITKEN et al., 2012). Se o H_2O_2 não for transformado em H_2O pela glutathione peroxidase ou catalase, então será transformado, através da reação de fenton, na presença de um cátion divalente, como o Fe^{2+} , em OH^- que é extremamente prejudicial à célula (BALAO DA SILVA et al., 2011a).

O estresse oxidativo também causa danos ao DNA. Tais danos oxidativos não específicos nos espermatozoides como, deleções cromossômicas, locais abásicos e mudanças de bases, criam uma predisposição a mudanças mutacionais no embrião. Estas mutações irão causar consequências no oócito recém fertilizado, que serão basicamente devido à reparação desse DNA aberrante e isto ocorre nas poucas horas entre a fusão do espermatozoide ao oócito e o início da primeira clivagem (AITKEN; BAKER, 2004).

Além dos danos já citados, as ROS ainda influenciam na capacitação e reação acrossômica. Níveis excessivos de ROS causam um efeito negativo alterando e impedindo a ação de substâncias presentes no plasma que bloqueiam a capacitação, deixando o espermatozoide mais permeável ao íon cálcio e alterando a membrana plasmática, levando assim à uma capacitação prematura (SARASWAT; KHARCHE; JINDAL, 2014).

Diante dos efeitos das espécies reativas nos espermatozoides, vários estudos são conduzidos com antioxidantes para tentar minimizar estas alterações, por exemplo, a utilização de vitamina E, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e cisteína em carneiros (BUCAK; ATEŞŞAHİN; YÜCE, 2008; LA FALCI et al., 2011), metionina, inositol, carnitina, cisteína e glutathione em bovinos (BUCAK et al., 2010; TUNCER et al., 2010), entre inúmeros outros.

Entretanto, qualquer discussão sobre estresse oxidativo seria incompleta se não mencionássemos o papel positivo das ROS na função espermática. A produção de pequenas quantidades de ROS é importante para o processo de capacitação, iniciando a cascata celular de interações com o oócito que culmina na fertilização (AITKEN; BAKER, 2004). Portanto, a presença de ROS apenas tem os efeitos maléficos citados, se estiverem em desequilíbrio.

2.3 MELATONINA

Em 1993 foi descoberta a função da melatonina em captar radicais livres do meio, agindo como um potente antioxidante direto. Isso foi demonstrado com o radical hidroxila *in vitro*. Desde então esta substância vem sendo muito estudada e utilizada. Há estudos do efeito da melatonina na mitocôndria, no sistema imune, gastrointestinal, nervoso, possui influência benéfica no câncer, na patofisiologia da gestação, entre outros (REITER et al., 2009; CARPENTIERI et al., 2012). O foco, nesta revisão, será seus efeitos antioxidantes no espermatozoide.

A melatonina, N-acetil-5-metoxi-triptamina, foi descoberta há cerca de 50 anos atrás e é um composto sintetizado principalmente pela glândula pineal, localizada no cérebro, mas também pela retina, timo, medula óssea, epitélio respiratório, pele, intestino, entre outros locais. Ela tem um importante papel na regulação dos processos patológicos e fisiológicos e é considerada como um hormônio que regula o ritmo circadiano (CARPENTIERI et al., 2012). Na espécie equina, tal como em muitas outras espécies animais, a produção de melatonina é inibida pela luz e estimulada pela escuridão, alcançando um pico a meio da noite e decrescendo a partir deste valor.

É uma indolamina contendo dois grupos funcionais, podendo se ligar ao receptor, ou usar sua propriedade anfifílica, dando à molécula a capacidade de entrar em qualquer célula, compartimento ou fluido corporal. Devido a sua alta solubilidade em lipídeos, passa facilmente por difusão da circulação periférica para outros fluidos ou células. Existem evidências de que a melatonina é a maior “neutralizadora” de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, tendo este efeito em concentrações fisiológicas ou farmacológicas (CARPENTIERI et al., 2012).

A natureza lipofílica da melatonina permite que ela atravesse as membranas celulares e facilmente chegue nos compartimentos intracelulares, incluindo a mitocôndria. A indolamina interage com a bicamada lipídica e estabiliza a membrana interna mitocondrial, isso pode melhorar a atividade da cadeia de transporte de elétrons (CARPENTIERI et al., 2012). Já que a maioria das ROS produzidas pelo espermatozoide são produtos do metabolismo mitocondrial, um antioxidante que possa agir nesse nível tende a ser uma boa opção para reduzir os efeitos do estresse oxidativo (GIBB; LAMBOURNE; AITKEN, 2014).

Diferentemente da maioria dos antioxidantes, a melatonina está desprovida de atividade peroxidativa, e todos os intermediários gerados pela interação com as espécies reativas, como 3-hidroximelatonina cíclica (3-OHM cíclica), N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AFM), também possuem efeito antioxidante (RAO; GANGADHARAN, 2008).

Além disso, ela regula a expressão de genes responsáveis pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutatona peroxidase (GPx), influenciando nos níveis destas proteínas com atividade enzimática celular sob condições fisiológicas ou oxidantes (RODRIGUEZ et al., 2004). O efeito antioxidante da melatonina em baixas concentrações parece ser indireto, através de *upregulation* da expressão do gene da GPx, enquanto que em altas concentrações seu efeito é direto, agindo com a eliminação de radicais livres do meio. Tem sido proposto que sua capacidade de *upregulation* com o sistema enzimático antioxidante envolve tanto a membrana quanto receptores nucleares (FISCHER et al., 2008).

Casao et al. em 2012, partindo da possibilidade da ação da melatonina ser por meio de receptores, pesquisaram e constataram a presença dos receptores MT1 e MT2 em espermatozoides de carneiros, entretanto, o mecanismo bioquímico não foi completamente elucidado, sugerindo que esta ação pode ser mais complexa do

que se pensava. Já em espermatozoides equinos esses receptores não foram encontrados, confirmando a complexidade e inúmeras possibilidades do mecanismo de ação da melatonina (BALAO DA SILVA et al., 2011).

A utilização da melatonina em equinos vem sendo estudada. Sua incubação durante 3 horas à 37°C, testando várias concentrações, mostrou que a melatonina teve um significativo efeito na redução da peroxidação lipídica, na redução da porcentagem de células com baixo potencial de membrana mitocondrial, dando um destaque para sua habilidade em proteger a mitocôndria, e na diminuição de fenômenos associados com apoptose, que podem estar aumentados em procedimentos de biotecnologias como a criopreservação (BALAO DA SILVA et al., 2011).

No sêmen refrigerado de garanhões, foi constatado que a melatonina aumentou a porcentagem de células com membranas íntegras (membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial) (AFFONSO, 2013). Devido a tais resultados tal hipótese foi expandida para o sêmen criopreservado, neste estudo.

2.4 ÁCIDO FERÚLICO

O ácido ferúlico é um constituinte de plantas que surge através do metabolismo da fenilalanina e tirosina, é o nome comum para 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-ácido propenóico (GRAF, 1992). Ocorre na forma de dois estereoisômeros: o ácido *trans*-ferúlico, e o ácido *cis*-ferúlico (URBANIÁK; SZELAG; MOLSKI, 2013). O ácido ferúlico isolado das plantas, normalmente, existe na forma do isômero *trans* (GRAF, 1992).

Em sistemas biológicos, este agente quelante, devido ao seu grupo carboxil e hidroxil fenólico, atua como antioxidante sequestrando metais do meio, retirando catalisadores como os íons de ferro dos substratos lipídicos, podendo efetivamente reduzir o grau de oxidação. A partir disso, conclui-se que a maior capacidade antioxidante do ácido ferúlico está na captação de radicais livres do meio, impedindo assim, que a reação em cadeia que levaria a peroxidação lipídica e ao estresse

oxidativo seja completada (GRAF, 1992). Ele possui grupos doadores de elétrons no anel benzeno, permitindo-lhe essa propriedade. Outro fato que lhe dá esta característica de potente antioxidante é por se tratar de um ácido carboxílico e conter uma dupla ligação C-C, o que pode proporcionar sítios de ataque aos radicais livres, impedindo assim que eles atuem nas membranas (ITAGAKI et al., 2009).

Além disso, uma de suas funções biológicas, está relacionada com a atividade metabólica celular através do aumento da ativação de AMPc e GMPc, que desempenham papel na motilidade espermática e também possui efeito inibindo o malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica (ZHENG; ZHANG, 1996).

Devido à sua potente ação antioxidante, há estudos da atuação deste componente em diversas áreas como na doença de Alzheimer, câncer, distúrbios cardiovasculares, diabetes mellitus, pele e toxicologia, além da sua identificação em diversos alimentos como banana, tomate, brócolis, laranja, café, alguns cereais, própolis, entre outros (MANCUSO; SANTANGELO, 2014).

Com relação às pesquisas com sêmen, o ácido ferúlico foi identificado como um dos componentes do própolis (na sua forma *trans*) e foi estudado seu efeito na motilidade, atividade respiratória mitocondrial e potencial de membrana mitocondrial em espermatozoides humanos. Neste trabalho, o própolis manteve a motilidade dos espermatozoides e o potencial de membrana mitocondrial, porém aumentou a atividade respiratória mitocondrial (complexos II e IV), sugerindo então que este componente melhora a eficiência respiratória total mitocondrial, tendo potencial para melhorar a motilidade (CEDIKOVA et al., 2014).

Zheng e Zhang (1996), em pesquisa com ácido ferúlico realizada com homens férteis e inférteis, observaram que as amostras tratadas com ácido ferúlico apresentaram melhores resultados nos dois grupos quanto a motilidade e os níveis intracelulares de AMPc e GMPc além da diminuição da peroxidação lipídica.

Quando o ácido ferúlico foi utilizado em sêmen refrigerado equino (AFFONSO, 2013), observou-se aumento significativo na porcentagem de células com membranas íntegras (membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial). Devido a isso, o ácido ferúlico foi o outro antioxidante escolhido para ser testado em sêmen criopreservado equino.

CAPÍTULO 2

VALIDAÇÃO DO USO DA Sonda FLUORESCENTE
CELLROX DEEP RED PARA DETECTAR
ESTRESSE OXIDATIVO EM
ESPERMATÓZOIDES EQUINOS

3 VALIDAÇÃO DO USO DA SONDA FLUORESCENTE CELLROX DEEP RED PARA DETECTAR ESTRESSE OXIDATIVO EM ESPERMATOZOIDES EQUINOS

3.1 INTRODUÇÃO

Os espermatozoides, desde que são produzidos nos testículos, passando pela ejaculação, trato genital da fêmea até a fecundação são constantemente expostos a ambientes oxidantes e são células muito susceptíveis ao estresse oxidativo pois possuem alto teor de ácidos graxos poli-insaturados como principais componentes de suas membranas celulares e intracelulares, além de suas baixas concentrações de citoplasmas e enzimas citoplasmáticas, o que limita sua capacidade de eliminação das ROS e sua capacidade de reparação aos danos causados ao DNA (LENZI et al., 1996).

Existem dois sistemas envolvidos na produção de ROS no espermatozoide, um deles é o sistema NADPH oxidase, na membrana plasmática. O outro sistema é o NADH oxido-redutase dependente, em níveis mitocondriais (AITKEN; BAKER, 2004). O metabolismo mitocondrial é a principal fonte de ROS do espermatozoide (GIBB; LAMBOURNE; AITKEN, 2014).

As ROS são capazes de atacar o DNA e as mitocôndrias, levando a perda de potencial de membrana mitocondrial, resultando na perda de motilidade espermática. Além disso, também podem atingir a membrana plasmática, fazendo com que a célula perca sua fluidez e, conseqüentemente, sua integridade. A indução de geração de ROS pelas mitocôndrias é o primeiro passo para ativação de mecanismos internos que levarão a cascata de apoptose, que é associada com várias mudanças que impedem o espermatozoide de participar do processo de fertilização (AITKEN et al., 2012).

Devido às ROS terem grande influência na funcionalidade do espermatozoide, a sua identificação em análises seminais também é importante. Existem alguns métodos capazes de mensurar o estresse oxidativo, como a sonda C11-BOBIPY,

que emite fluorescência vermelha, porém, na presença de ROS, ocorre a peroxidação lipídica e ela muda da cor vermelha para a fluorescência verde, podendo ser lida no citômetro de fluxo ou na microscopia a laser confocal (BALL; VO, 2002; BROUWERS; SILVA; GADELLA, 2005; RAPHAEL et al., 2008), as sondas MitoSOX Red[®], que detecta apenas o ânion superóxido, a H₂DCF, que detecta somente o peróxido de hidrogênio (AITKEN et al., 2013), a DCFH-DA, que atravessa a membrana celular na sua forma não fluorescente e ao entrar em contato com espécies reativas dentro do espermatozoide, emitirá fluorescência. O DCFH-DA possui a vantagem de quantificar o estresse oxidativo por meio da leitura por citometria de fluxo ou fluorimetria, tendo como desvantagem identificar apenas o peróxido de hidrogênio (WANG; JOSEPH, 1999).

Levando em consideração a importância das ROS na função espermática e as desvantagens ainda existentes nos métodos de avaliação do estresse oxidativo em espermatozoides, abre-se campo para estudo de novas técnicas. A sonda CellRox Deep Red Reagent[®] (CAT 10422, Molecular Probes) detecta a produção de ROS emitindo fluorescência vermelha na presença das espécies reativas e não emitindo fluorescência caso a célula não esteja em estresse oxidativo, sendo ela capaz de detectar o radical hidroxila e o ânion superóxido, com mais sensibilidade ao radical hidroxila. Além disso, há a possibilidade de ser lida no microscópio de epifluorescência, citometria de fluxo e espectrofotometria. Ainda, podendo ser associada com outras sondas e fixada para leitura a posteriori (GRINBERG et al., 2013; ALVES, 2014).

O CellRox Deep Red Reagent[®], dentro da andrologia atual, só foi testado em espermatozoides de carneiros com estresse oxidativo induzido *in vitro* e *in vivo* para validação da técnica (ALVES, 2014) e devido à equivalente importância do estresse oxidativo para espermatozoides equinos e à diferença celular, o estudo foi expandido para esta espécie. Portanto, o objetivo deste trabalho é validar a técnica de detecção das ROS por meio da sonda CellRox Deep Red Reagent[®] pela primeira vez em espermatozoides de garanhões.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) e no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES), ambos pertencentes ao Departamento de Reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizados no Campus Administrativo de Pirassununga.

3.2.2 Animais

Foram utilizados 4 garanhões, que possuíam entre 9 e 25 anos, pertencentes ao Setor de Equideocultura da Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga. Antes do início do trabalho os animais passaram por um nivelamento biológico efetuando-se 4 colheitas de sêmen regulares em todos eles durante uma semana. Os garanhões foram mantidos sob as mesmas condições de manejo durante o experimento, sendo alojados em baias, e soltos em piquetes apropriados individuais três vezes por semana, sendo alimentados com feno, capim e concentrado de acordo com as indicações do NRC, tendo água e sal mineral fornecidos *ad libitum*. As colheitas do sêmen para este trabalho foram realizadas com um intervalo de no mínimo dois dias por garanhão.

3.2.3 Colheita do sêmen

Para este experimento, foram realizadas 4 repetições de colheitas de sêmen de cada garanhão. Para cada repetição foram utilizados 2 ejaculados, com intervalo

de 90 minutos entre eles. Previamente à cada colheita foi realizada a higienização do pênis dos garanhões com algodão umedecido em água a aproximadamente 35°C. Os ejaculados foram obtidos com vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma, Botucatu, SP), com temperatura interna de sua mucosa de 42 a 45°C.

3.2.4 Procedimentos laboratoriais

Logo após a colheita, o sêmen foi filtrado para separação da parte rica em espermatozoides da gelatinosa e realizada a análise subjetiva da motilidade e vigor espermático. Em seguida foi realizada a concentração espermática utilizando-se câmara de Neubauer.

O primeiro ejaculado foi diluído em meio TALP *sperm* a 25×10^6 espermatozoides/mL para preparo da amostra *in natura* em que não era realizado a indução do estresse oxidativo (T0), e na outra era realizada a indução do estresse oxidativo (T100).

Para a indução do estresse oxidativo, uma amostra de 1000µL do sêmen foi centrifugada a 500xg durante 10 minutos para retirada do plasma seminal, em seguida o sobrenadante era retirado e o sedimento ressuspendido em 200µL de TALP, 50µL de ácido ascórbico (20mM), 50µL de sulfato de ferro (4mM), 30µL de t-Butilhidroperóxido (15mM) e incubada a 37°C durante 90 minutos (Adaptado de ALVES, 2014).

O segundo ejaculado foi colhido após os 90 minutos de incubação da indução do estresse oxidativo. Este segundo ejaculado foi utilizado para o preparo da terceira amostra (T50), contendo 50% do sêmen do segundo ejaculado diluído em TALP *sperm* (não induzido) e 50% do sêmen da amostra T100 (com estresse oxidativo induzido).

3.2.5 Preparo da amostra para análise de ROS

Foi utilizada a sonda fluorescente CellROX Deep Red Reagent® 2,5mM (Invitrogen), diluída em dimetil sulfóxido (DMSO, código 472301, Sigma-Aldrich) para uma solução de trabalho com a concentração final de 1mM. Após o preparo, foi armazenada a -20° C, protegida da luz. No momento da utilização, a solução trabalho contendo CellROX Deep Red Reagent® era mantida no escuro a 37°C.

Para o preparo da técnica foram utilizados 200 µL (25×10^6 espermatozoides/mL) de cada amostra do sêmen (T0, T50 e T100) e adicionados 4µL de CellROX® (1mM, Invitrogen) e 2µL de Hoescht 33342 (0,5mg/mL, Molecular Probes), sendo a amostra incubada a 37°C por 30 minutos para posterior leitura. Após a incubação, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 2.000xg, o sobrenadante foi retirado e o sedimento foi suspenso em 200µL de TALP.

3.2.6 Avaliação do estresse oxidativo

Uma gota de 4µL da solução incubada com a sonda fluorescente CellRox® foi colocada entre lâmina e lamínula para leitura em microscópio de epifluorescência (modelo 80i, Nikon, Tóquio, Japão) em aumento de 1.000x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm).

Foram avaliadas 200 células e classificadas em duas categorias: 1 - sem estresse oxidativo (peça intermediária não corada) e 2 - com estresse oxidativo (peça intermediária corada em vermelho), como demonstrado na figura 1.

Figura 1 - Espermatozoides equinos corados com as sondas fluorescentes CellRox Deep Red® e Hoescht 33342

Fonte: (LANÇONI, 2015).

Notas: Em A observamos espermatozoides equinos sem estresse oxidativo (peça intermediária não corada). Em B observamos espermatozoides com estresse oxidativo (peça intermediária corada em vermelho).

3.2.7 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias. Quando a normalidade e/ou homogeneidade do teste foi significativa ($P < 0,05$), os dados foram transformados e reavaliados. Os dados de porcentagem de células positivas (com estresse oxidativo) foram submetidos à análise de regressão polinomial pelo modelo linear generalizado (PROC GLM) do SAS (Versão 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) para determinação do modelo, equação de regressão e valor do coeficiente de determinação (R^2) do modelo. Para determinação do modelo, a probabilidade de $P \leq 0,05$ foi considerada como significativa.

3.3 RESULTADOS

O resultado da regressão polinomial aplicada na análise apresentou efeito quadrático na equação da reta, alto valor de coeficiente de determinação ($R^2=0,88$) e valor de P altamente significativo ($P<0,0001$).

Gráfico 1 – Gráfico de Regressão Polinomial para a porcentagem de células positivas ao estresse oxidativo em função dos tratamentos (0, 50 e 100), avaliadas pela sonda fluorescente CellRox em ejaculados de garanhões

Notas: Os dados estão apresentados como regressão polinomial de segunda ordem, com a respectiva equação do modelo, coeficiente de determinação (R^2) e valor de probabilidade (P).

3.4 DISCUSSÃO

Em equinos, o estresse oxidativo é particularmente importante pois a refrigeração e transporte do sêmen para posterior inseminação artificial são práticas rotineiras na criação (ARRUDA et al., 2009). Pesquisas sugerem que a diminuição

na funcionalidade do espermatozoide equino após o armazenamento a 5°C pode ser devido ao dano oxidativo causado por um aumento na geração de ROS durante a refrigeração (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2011).

Para a indução do estresse oxidativo neste experimento, foi utilizado o ácido ascórbico, sulfato de ferro e t-Butilhidroperóxido (BALL; VO, 2002). Tais substâncias foram escolhidas devido à reação de Fenton, que é a responsável por transformar o peróxido de hidrogênio em radical hidroxila, através do ferro. Ela ocorre, basicamente, com a reação entre uma molécula de Fe^{2+} e outra de H_2O_2 , resultando na produção de uma molécula de $\text{OH}^\cdot$, um OH e um Fe^{3+} . Dentre as substâncias adicionadas, o ácido ascórbico tem a função de reduzir o ferro, o t-Butilhidroperóxido é um hidroperóxido que tem a função de catalisar a reação. Em resumo, esta técnica tem como base a formação de íons de ferro que irão catalisar a quebra de hidroperóxidos iniciando a reação em cadeia da peroxidação lipídica (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993; NICHI et al., 2006).

Os ganhões, de uma forma geral, possuem grande quantidade de plasma seminal, se compararmos com outras espécies. No sêmen estão presentes altas concentrações de ascorbato, urato e grupos tiol, e em menor quantidade, também estão presentes glutathione, e α -tocoferol (LI, 1975), além das enzimas antioxidantes como catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase (SANOKA et al., 1996). Estes componentes dão ao plasma seminal uma ação antioxidante. Por isso, a amostra que sofreu a indução da oxidação, neste experimento, foi centrifugada para retirada do plasma seminal.

Seguindo os procedimentos citados acima, obteve-se sucesso na indução do estresse oxidativo e na detecção dele pela sonda em questão, como observado no gráfico 4. A equação da reta apresentou um desvio quadrático devido ao grupo T50, que apresentou resultados ligeiramente maiores do que o esperado, que seria 50% de células em estresse oxidativo. Este resultado pode ser explicado ao analisar a metodologia, sendo que a amostra T50 era composta com 100µL do sêmen diluído que havia acabado de ser coletado e 100µL da amostra de sêmen com estresse oxidativo induzido, em seguida era feita a incubação. Porém, esta sonda possui um tempo alto de incubação (30 minutos) possibilitando que durante a incubação tenha ocorrido um leve efeito dos indutores de oxidação utilizados na amostra T100. Foram realizados ensaios preliminares ao experimento e testados outros tempos de

incubação para que esse efeito fosse diminuído, porém, para uma correta ligação da sonda às ROS este período era necessário.

A comparação direta dos resultados obtidos pelo o CellRox® com as outras sondas como C11-BOBIPY, MitoSOX Red®, H₂DCF e DCFH-DA não é viável, pois o C11-BOBIPY avalia a peroxidação lipídica (BALL; VO, 2002), e não diretamente as ROS, já as outras como MitoSOX Red®, H₂DCF e DCFH-DA detectam apenas um tipo de espécie reativa sendo, respectivamente, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio no caso das duas últimas (WANG; JOSEPH, 1999; AITKEN et al., 2013).

3.5 CONCLUSÃO

Em virtude do que foi mencionado, podemos concluir de uma forma inédita que a sonda fluorescente CellRox Deep Red® é capaz de detectar espécies reativas de oxigênio, indicando estresse oxidativo em espermatozoides de garanhões.

CAPÍTULO 3

USO DA MELATONINA E DO ÁCIDO FERÚLICO COMO PROMOTORES DA FUNÇÃO DO ESPERMATOZOIDE EQUINO CRIOPRESERVADO

4 USO DA MELATONINA E DO ÁCIDO FERÚLICO COMO PROMOTORES DA FUNÇÃO DO ESPERMATOZOIDE EQUINO CRIOPRESERVADO

4.1 INTRODUÇÃO

A criopreservação causa danos irreversíveis à atividade enzimática e às organelas do espermatozoide que conduzem a redução dos parâmetros cinéticos da célula. Além disso, os sistemas antioxidantes do plasma seminal e da célula espermática são comprometidos durante este procedimento (ALVAREZ; STOREY, 1992).

Particularmente, em equinos, as taxas de prenhez são muito variáveis, indo de 35 a 90% e tendem a ser significativamente menores do que em outros animais domésticos (MORRIS; ALLEN, 2002). Isso ocorre porque, diferentemente de outros machos, os garanhões se tornam reprodutores baseados principalmente no pedigree, na sua performance, desempenho, conformação, e há pouca consideração na sua real capacidade reprodutiva. Consequentemente, a “indústria” do cavalo trabalha com reprodutores de fertilidade menor do que o considerado normal em outras espécies (VARNER; GIBB; AITKEN, 2014).

Para que a técnica de criopreservação seminal possa apresentar melhores resultados em garanhões, é necessário um estudo mais amplo sobre os vários aspectos relacionados à fisiologia do espermatozoide, aos processos de criopreservação e à melhoria dos testes aplicados para analisar as células espermáticas submetidas a congelação e descongelação, uma vez que os danos ocasionados pela criopreservação afetam as funções celulares, resultando em redução da fertilidade (ARRUDA, 2000). Tais lesões são devido aos procedimentos envolvidos, como a centrifugação, as diferenças de pH e osmolaridade e as quedas de temperatura que o sêmen será exposto.

Um dos fatores que podem aumentar a vulnerabilidade dos espermatozoides durante a manipulação do sêmen é a produção de ROS, responsáveis por danos na membrana plasmática, levando a possíveis perdas de motilidade e potencial fertilizante (AURICH, 2005). Aitken et al. afirmaram, em 2012, que uma das

descobertas mais importantes dos últimos anos é que um dos maiores causadores dos danos de função espermática é o estresse oxidativo. Os antioxidantes melatonina e ácido ferúlico, que ainda são muito pouco estudados em criopreservação de sêmen equino, podem possuir características moleculares vantajosas para adição ao diluidor de criopreservação com o intuito de otimizar esse processo. Os tratamentos com antioxidantes no sêmen em geral, vem variando ao longo do tempo, envolvendo a utilização de vários compostos diferentes, como a carnitina, pentoxifilina, vitaminas A, E e C, sem a devida atenção para combater o dano lipoperoxidativo (LANZAFAME et al., 2009). Já os escolhidos para este trabalho possuem esta marcante característica de diminuir a peroxidação lipídica e, conseqüentemente os danos causados por ela (GRAF, 1992; BALAO DA SILVA et al., 2011).

A melatonina (MEL) tem efeitos benéficos em vários sistemas do organismo, como no sistema imune, gastrointestinal e nervoso, além de possuir influência terapêutica sobre o câncer, patofisiologia da gestação, nas mitocôndrias, e grande parte dos estudos focam na sua ação antioxidante. A natureza anfifílica da melatonina, permite que ela atravesse as membranas celulares e facilmente acesse os compartimentos intracelulares, incluindo a mitocôndria. Além disso, a indolamina interage com a bicamada lipídica e estabiliza a membrana interna mitocondrial, isso pode melhorar a atividade da cadeia de transporte de elétrons (REITER et al., 2009; CARPENTIERI et al., 2012).

O ácido ferúlico (AF) é um constituinte de plantas que surge do metabolismo da fenilalanina e tirosina. Sua capacidade antioxidante está na captação de radicais livres do meio, impedindo assim, que a reação em cadeia que levaria à peroxidação lipídica e ao estresse oxidativo seja completada (GRAF, 1992). Além disso, ele também atua inibindo o malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica (ZHENG; ZHANG, 1996).

Portanto, baseado no que foi citado acima, o sêmen criopreservado é de extrema importância na espécie equina, porém, apesar desta biotécnica ter evoluído desde que surgiu, ainda há muito o que ser estudado para que ela seja mais utilizada e apresente índices de fertilidade cada vez melhores. Devido à grande importância do estresse oxidativo nas células espermáticas equinas durante o processo de criopreservação, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos

dos antioxidantes, melatonina e ácido ferúlico, sobre as características de movimento espermático, a morfologia espermática, a integridade de membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) e no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES), ambos pertencentes ao Departamento de Reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizados no Campus Administrativo de Pirassununga. As colheitas foram realizadas no período de janeiro a abril de 2014.

4.2.2 Animais

Foram utilizados 4 garanhões dos quais foram obtidos 5 ejaculados. Os animais possuíam idades entre 9 e 25 anos e pertenciam ao Setor de Equideocultura da Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga.

Antes do início do trabalho os animais passaram por um nivelamento biológico efetuando-se 4 colheitas de sêmen regulares em todos eles durante uma semana. Os garanhões foram mantidos sob as mesmas condições de manejo durante o experimento, sendo alojados em baias, e soltos em piquetes apropriados individuais três vezes por semana, sendo alimentados com feno, capim e concentrado de acordo com as indicações do NRC, tendo água e sal mineral

fornechos *ad libitum*. As colheitas de sêmen foram realizadas com intervalo de no mínimo dois dias por garanhão.

4.2.3 Colheita do sêmen

Previamente à cada colheita foi realizada a higienização do pênis dos garanhões com algodão umedecido em água a aproximadamente 35°C. Os ejaculados foram obtidos com vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma, Botucatu, SP), com temperatura interna de sua mucosa de 42 a 45°C.

4.2.4 Procedimentos laboratoriais pré-congelação

Logo após a colheita, o sêmen foi filtrado para separação da parte rica em espermatozoides da gelatinosa, fazendo-se a leitura do volume diretamente em Becker graduado pré-aquecido a 37°C. Em seguida foi diluído na proporção de 1 parte de sêmen para 1 parte de diluidor comercial a base de leite desnatado (Botu-Sêmen®, Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil). Após cinco minutos da diluição, foram analisadas de forma subjetiva a motilidade (%) e o vigor (1-5), sendo selecionados ejaculado que possuíam, no mínimo, 50% de motilidade e 2 de vigor. Posteriormente o sêmen foi dividido em tubos de 15 mL e centrifugado a 500xg durante 12 minutos.

Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado e adicionado 700µL dos respectivos diluidores de congelação para manutenção da célula durante a avaliação da concentração espermática em câmara de Neubauer, em seguida o sêmen diluído foi ressuspendido para concentração final de 160×10^6 espermatozoides/mL.

4.2.5 Tratamentos experimentais

As amostras de sêmen foram criopreservadas em 5 diluidores (tratamentos) diferentes. Para o tratamento controle utilizou-se o diluidor comercial Botucrio® (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil). Já para os outros quatro tratamentos foram adicionados ao Botucrio® a melatonina (Sigma-Aldrich, 1001352564) e o ácido ferúlico (Sigma-Aldrich, 128708-25G) nas suas devidas concentrações, como descrito a seguir.

As soluções estoque de cada tratamento foram preparadas previamente, diluídas em DMSO e então adicionadas ao diluidor de criopreservação e congeladas em alíquotas. Dentre as soluções estoque estavam: AF 1M (utilizada para preparação das soluções de trabalho AF 0,5mM e AF 1,2mM), MEL 1M (utilizada para preparação da solução de trabalho MEL 2mM) e MEL 1mM (utilizada para preparação da solução de trabalho MEL 1µM).

Os tratamentos foram denominados da seguinte forma:

- 1 - CONT- Controle.
- 2 - AF 0,5mM- Ácido Ferúlico na concentração final de 0,5mM.
- 3 - AF 1,2mM- Ácido Ferúlico na concentração final de 1,2mM.
- 4 - MEL 2mM- Melatonina na concentração final de 2mM.
- 5 - MEL 1µM - Melatonina na concentração final de 1µM.

4.2.6 Criopreservação do sêmen

Depois que o sêmen já havia sido centrifugado e ressuspendido no diluidor específico de congelação a uma concentração de 160×10^6 espermatozoides/mL, como descrito anteriormente, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,50mL, cuidadosamente lacradas com álcool polivinílico e identificadas com o nome do garanhão, a data (partida do ejaculado) e o tratamento referente àquela palheta.

A criopreservação do sêmen foi realizada utilizando o equipamento TK 3000® (TK tecnologia em congelação LTDA, Uberaba, MG, Brasil) composto por um aparelho programável, equipado com um porta-palhetas, um tubo de refrigeração e uma caixa térmica para nitrogênio líquido.

As palhetas foram colocadas no porta-palhetas, o qual foi acondicionado ao compartimento de refrigeração, permanecendo neste até alcançar 5°C, obedecendo uma curva de refrigeração de -0,25°C/min, com duração de aproximadamente 1 hora e 15 minutos. Ao atingir esta temperatura a amostra permanecia por mais 30 minutos em estabilização (tempo de equilíbrio). Em seguida, o porta-palhetas foi transferido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido na qual a curva de congelação foi procedida. Nesta, a temperatura diminuía -15°C/min de 5°C até -80°C, após alcançar essa temperatura, a queda passava a ser de -10°C/min até -120°C. Esta curva durava em média 12 minutos e em seguida as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido (-196°C).

Após o término desse procedimento, as palhetas foram organizadas em *racks*, separadas por tratamentos e devidamente identificadas e armazenadas em botijão criogênico.

4.2.7 Análises do sêmen pós-descongelção

As amostras foram avaliadas quanto as características de motilidade, morfologia, integridade de membranas espermáticas e produção de ROS no espermatozoide.

4.2.7.1 Características da motilidade espermática

A motilidade espermática foi avaliada pelo sistema CASA (programa SCA - Sperm Class Analyser; MICROPTIC, Barcelona, Espanha). O *setup* foi ajustado

previamente para análise de espermatozoides equinos. Para a avaliação, a amostra espermática foi diluída em 40×10^6 espermatozoides/mL em Botucurio® sem crioprotetor e pré-aquecido a 37°C. Para esta avaliação foi utilizada a câmara de Makler® (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel), colocando-se uma gota de 10µL sobre ela. Foram analisadas as seguintes características: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade do trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e porcentagem de células rápidas (RAP, %).

4.2.7.2 *Avaliações da morfologia espermática*

As avaliações das características morfológicas dos espermatozoides foram realizadas pela técnica de câmara úmida. A amostra espermática foi fixada em formol salino tamponado 4% previamente aquecido a 37° C. Foram avaliadas 200 células sob microscopia de contraste de interferência diferencial - DIC (Nikon, Modelo Eclipse 80i, Tóquio, Japão) com aumento de 1.000x.

4.2.7.3 *Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial*

Para esta análise, foi utilizado 150µL de sêmen diluído em meio TALP *sperm*, na concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL, em tubo de microcentrífuga e adicionados 3µL de iodeto de propídeo (PI 0,5mg/mL), 2µL de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL), 6µL de 5,5',6,6'-tetrachloro- 1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1 153µM) e 80µL de aglutinina de Pisum sativum conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA 100µg/mL). Em seguida, a amostra foi incubada durante 8 min a 37°C no escuro. Técnica adaptada de Celeghini et al. (2010).

Para leitura, foi preparada gota úmida de 4µL entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C, lidas em aumento de 1000x em microscopia de epifluorescência (Nikon, Modelo Eclipse Ni-U 80i, Tóquio, Japão) utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm). Foram contadas 200 células e classificadas segundo seus padrões de coloração em 8 categorias:

Quadro 1 - Classificação das células de acordo com a integridade de membranas plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial, detectadas pelas sondas PI, FITC-PSA e JC-1, respectivamente

Categorias	Siglas
Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial.	PIAIA
Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial.	PIAIB
Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial.	PIALA
Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial.	PIALB
Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial.	PLAIA
Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial.	PLALA
Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial.	PLAIB
Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial.	PLALB

Fonte: Nascimento (2006).

A partir dessas 8 categorias, as variáveis consideradas foram: porcentagem de células inteiramente íntegras, ou seja, com membrana plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA); porcentagem de células com membrana plasmática íntegra (MPI); porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial (APM) e porcentagem de células com membrana acrossomal intacta (AI).

4.2.7.4 Avaliação da produção de ROS

A avaliação da produção de ROS foi realizada com a sonda fluorescente Cell Rox Deep Red[®] (Invitrogen), como validado no capítulo 2. Foi utilizado 200µL de sêmen diluído em meio TALP *sperm*, em uma concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL e adicionado 4µL de Cell Rox Deep Red[®] (1mM), 2µL de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL) e incubado durante 30 minutos a 37° no escuro. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 2000xg durante 5 minutos, em seguida o sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspendido em 200µL de TALP para que fosse realizada a leitura em uma gota de 4µL entre lâmina e lamínula previamente aquecidas. Foram contadas 200 células em microscopia de epifluorescência (Nikon, Modelo Eclipse Ni-U 80i, Tóquio, Japão) em aumento de 1.000x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm). As células foram classificadas em duas categorias: sem estresse oxidativo (peça intermediária não corada) ou com estresse oxidativo (peça intermediária corada em vermelho).

4.2.8 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias. Quando a normalidade e/ou homogeneidade do teste foi significativa ($P < 0,05$), os dados foram transformados e reavaliados. Comparações entre os tratamentos foram realizadas pelo modelo linear generalizado (PROC GLM) do SAS (Versão 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA), tendo o tratamento como efeito fixo e como efeitos aleatórios os ganhões e o ejaculado dentro de cada ganhão. As diferenças entre tratamentos foram obtidas por meio do teste de Duncan. A probabilidade de $P \leq 0,05$ foi considerada como diferença significativa e probabilidade entre $P > 0,05$ e $P \leq 0,10$ foi considerada como diferença aproximando-se de ser significativa (tendência estatística). Os dados

foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), a não ser por indicação contrária.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Características da motilidade espermática

Na tabela 1 podemos observar que houve redução da MT com adição de MEL 2mM, não notando-se diferenças entre os outros tratamentos. A MP foi melhor no controle e pior nos tratamentos AF 1,2mM e MEL 2mM. A porcentagem de células rápidas se igualou entre os tratamentos e somente foi menor estatisticamente no tratamento MEL 2mM. As características VCL, VSL, VAP, ALH e BCF não tiveram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Já a linearidade teve menores resultados apenas no tratamento AF 1,2mM. A retilinearidade foi melhor no tratamento controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias ($\pm$ E.P.M.) das características de motilidade (CASA-SCA) em espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos

Características espermáticas	Tratamentos					Média
	Controle	Ácido Ferúlico		Melatonina		
		0.5 mM	1.2 mM	2 mM	1 µM	
Motilidade Total (%)	71,19 ± 2,69 ^a	70,68 ± 2,62 ^a	71,10 ± 3,02 ^a	65,14 ± 2,36 ^b	70,24 ± 2,41 ^a	69,66 ± 1,18
Motilidade Progressiva (%)	41,71 ± 1,41 ^a	38,60 ± 1,52 ^{bc}	37,50 ± 1,13 ^c	36,80 ± 1,42 ^c	40,56 ± 1,47 ^{ab}	39,03 ± 0,64
Células rápidas (%)	32,62 ± 2,41 ^a	33,26 ± 2,70 ^a	33,31 ± 2,79 ^a	28,30 ± 2,26 ^b	32,85 ± 2,74 ^a	32,07 ± 1,15
Velocidade curvilínea (µm/s)	92,22 ± 1,22	92,01 ± 1,93	92,80 ± 1,75	90,47 ± 1,47	93,00 ± 1,34	92,10 ± 0,69
Velocidade progressiva (µm/s)	62,34 ± 1,12	60,78 ± 1,68	59,91 ± 1,15	60,84 ± 1,41	63,10 ± 1,01	61,39 ± 0,58
Velocidade de trajeto (µm/s)	76,37 ± 1,33	76,14 ± 2,00	75,75 ± 1,55	74,65 ± 1,62	77,67 ± 1,64	76,11 ± 0,73
Linearidade (%)	67,67 ± 1,09 ^a	66,07 ± 1,16 ^{ab}	64,81 ± 1,32 ^b	67,28 ± 1,20 ^a	67,90 ± 0,80 ^a	66,74 ± 0,51
Retilinearidade (%)	81,73 ± 1,06 ^a	79,87 ± 0,98 ^{bc}	79,29 ± 1,17 ^c	81,54 ± 1,00 ^{ab}	81,45 ± 0,76 ^{ab}	80,77 ± 0,45
Deslocamento lateral da cabeça (µm)	2,75 ± 0,08	2,75 ± 0,08	2,87 ± 0,11	2,76 ± 0,09	2,73 ± 0,08	2,77 ± 0,04
Frequência de batimentos (Hz)	8,86 ± 0,13	8,75 ± 0,10	8,76 ± 0,14	8,89 ± 0,13	8,76 ± 0,15	8,80 ± 0,06

a, b, c Linhas com letras sobresscritas minúsculas diferentes, diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

4.3.2 Características morfológicas

Na tabela 2 estão descritos os resultados da morfologia. As amostras tratadas com AF 1,2mM, MEL 2mM e MEL 1 μ M apresentaram menores quantidades de defeitos maiores e totais, porém, as amostras não se diferenciaram quanto aos defeitos menores.

Tabela 2 - Médias ($\pm$ E.P.M.) das características morfológicas em espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos

Características morfológicas	Tratamentos					Média
	Controle	Ácido Ferúlico		Melatonina		
		0.5 mM	1.2 mM	2 mM	1 µM	
Defeitos maiores (%)	16,88 ± 1,23 ^a	15,28 ± 1,03 ^{ab}	14,17 ± 1,12 ^b	13,63 ± 1,08 ^b	14,63 ± 0,96 ^b	14,91 ± 0,49
Defeitos menores (%)	2,35 ± 0,42	2,10 ± 0,32	1,65 ± 0,26	2,25 ± 0,31	2,18 ± 0,34	2,11 ± 0,15
Defeitos totais (%)	19,23 ± 1,42 ^a	17,38 ± 1,16 ^{ab}	15,82 ± 1,23 ^b	15,88 ± 1,27 ^b	16,8 ± 1,12 ^b	17,02 ± 0,56

^{a,b} Linhas com letras sobscritas minúsculas diferentes, diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Entre os defeitos maiores, as alterações que mais se diferenciaram foram gota protoplasmática proximal e cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa e os resultados estão descritos no gráfico 2.

Gráfico 2 - Médias ($\pm$ E.P.M.) das características de morfologia em espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos

Notas: Paine A: Gota protoplasmática proximal (GPP, %). Paine B: Cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa (DGA, %). ^{a,b,c} Barras com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

4.3.3 Integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

A porcentagem de células PIAIA, MPI e APM foi significativamente maior no tratamento MEL 1 μ M, sendo que no MPI ele se diferenciou estatisticamente apenas do tratamento MEL 2mM e se igualou aos demais. Quanto ao AI os tratamentos não se diferenciaram estatisticamente (Gráfico 2). Com isso, pode-se interpretar que a porcentagem de células PIAIA foi significativamente maior no tratamento MEL 1 μ M devido à porcentagem de células APM.

Gráfico 3 - Médias ($\pm$ E.P.M.) das características espermáticas de integridade de membranas plasmática, acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial avaliadas por sondas fluorescentes em espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos

Notas: Paineis A: Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA %). Paineis B: Membrana plasmática intacta (MPI, %). Paineis C: Acrossomo intacto (AI, %). Paineis D: Alto potencial de membrana mitocondrial (APM, %). ^{a,b,c} Barras com letras minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

4.3.4 Produção de ROS

No gráfico 3 podemos observar que a adição dos tratamentos não afetou a produção de ROS.

Gráfico 4 - Médias ($\pm$ E.P.M.) da produção de ROS pela sonda fluorescente CellRox em espermatozoides criopreservados de garanhões submetidos à diferentes tratamentos

Notas: Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

4.4 DISCUSSÃO

Entre os dados de motilidade, a maioria das características não apresentaram diferença estatística. Apenas os tratamentos MEL 2mM e AF 1.2mM foram os que obtiveram resultados inferiores. As características MT, MP e RAP foram significativamente menores para os espermatozoides submetidos ao tratamento MEL 2mM, diferentemente do que ocorreu em espermatozoides bovinos que, dentre

outras concentrações de melatonina (0.1, 1, 2, 3 e 4mM) os melhores resultados foram com 2 e 3 mM (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013). O efeito do AF 1.2mM apresentou MP, LIN e STR significativamente menores que o controle, o que revela uma característica do movimento espermático insatisfatória, não demonstrando movimentos favoráveis.

Em relação à integridade de membranas, o tratamento MEL 1 μ M, apresentou resultados positivos e benéficos aos espermatozoides, demonstrando significativamente maior porcentagem de células PIAIA e maior porcentagem de células com APM, sendo que também se apresentou visivelmente melhor na porcentagem de células com MPI, porém se diferenciou estatisticamente apenas do tratamento MEL 2mM. Tais resultados com a MEL 1 μ M corroboram com resultados obtidos por Afonso (2013) com a utilização da melatonina no diluidor de sêmen refrigerado à base de leite desnatado.

Doses extremas de antioxidantes durante a congelação podem neutralizar o estresse oxidativo excessivamente e assim impedir as funções fisiológicas das ROS nos espermatozoides, prejudicando a função da célula (ROCA et al., 2004). Tal fato pode ter ocorrido com os tratamentos AF 1,2 mM e MEL 2mM, que continham as maiores concentrações dos antioxidantes em questão e que tiveram resultados ligeiramente inferiores quanto aos padrões de motilidade e integridade de membranas. Isto também foi descrito em outro trabalho com diversas concentrações de melatonina em sêmen de touros, no qual a maior concentração (4mM) foi prejudicial (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013).

Quanto ao alto potencial de membrana mitocondrial no tratamento MEL 1 μ M, observado neste trabalho, Balao da Silva e colaboradores, 2011, constataram que a melatonina foi capaz de aumentar a porcentagem de espermatozoides com atividade mitocondrial depois de uma hora de incubação a 37°C, indicando que ela age a nível mitocondrial nos espermatozoides de garanhões, isto é especialmente importante pois esta é a estrutura espermática mais sensível ao estresse induzido pelas biotécnicas que envolvem manipulação ou processamento do sêmen.

O fato do tratamento MEL 1 μ M ter sido significativamente melhor nas integridades de membranas (plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial) mas não ter tido diferença estatística com relação a motilidade, vai de

encontro com os resultados obtidos em outros trabalhos com a melatonina no sêmen *in natura* de garanhões (BALAO DA SILVA et al., 2011; AFFONSO, 2013). Tais estudos comprovaram que a melatonina tem potente ação antioxidante no sêmen de garanhões e que ela não traz nenhum efeito deletério aos parâmetros analisados no sêmen (BALAO DA SILVA et al., 2011).

O uso da melatonina vem sendo descrito na andrologia não apenas pela sua adição diretamente no sêmen, mas sua suplementação exógena, em períodos não reprodutivos de espécies sazonais, como os carneiros, causando aumento da fertilidade. Este aumento nos parâmetros reprodutivos provavelmente foi devido ao melhor funcionamento do eixo hipófise-gonadal induzido pela melatonina (MISZTAL; ROMANOWICZ; BARCIKOWSKI, 2002; CASAO et al., 2010). Outra característica e uma das mais originais da melatonina é que, ao contrário de outros antioxidantes clássicos, ela não promove a oxidação em circunstância alguma e seus metabólitos também são capazes de agir como antioxidantes (TAN et al., 2000). Além disso, ela também aumenta a atividade de antioxidantes endógenos como a glutathione peroxidase e superóxido dismutase (MAYO et al., 2002).

O ácido ferúlico foi estudado em humanos e teve efeitos positivos na viabilidade e motilidade do sêmen de homens férteis e inférteis. Dentre as concentrações de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 e 1.6mM, os efeitos foram melhores quanto maiores as concentrações. Estes resultados demonstram que a inibição da peroxidação lipídica causada pelo ácido ferúlico nos espermatozoides é um dos principais mecanismos responsáveis por melhorar a viabilidade e motilidade da célula (ZHENG; ZHANG, 1996). Sua capacidade de eliminar radicais livres e consequentemente inibir a peroxidação lipídica está relacionada com sua estrutura química que permite o mecanismo de doação de um elétron ou captação de hidrogênio, eliminando as ROS (GRAF, 1992). Além disso, ele está relacionado com o aumento da ativação de AMPc e GMPc, que desempenham papel na motilidade espermática, justificando a melhora da motilidade no trabalho citado. Adicionalmente, o AF também possui efeito inibindo o malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica. Estes dois nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc), além de melhorar a motilidade, podem aumentar a atividade metabólica da célula através da ativação de uma série de sistemas enzimáticos, aumentando assim, a produção de ATP (ZHENG; ZHANG, 1996).

No trabalho de Affonso (2013), utilizando-se sêmen refrigerado equino, foi constatado que o AF causava efeitos ao sêmen, se diferenciando do controle em porcentagem de células PIAIA e com APM, justificando a expansão do estudo para espermatozoides criopreservados. Porém, na presente pesquisa o AF não manteve seus efeitos benéficos e se igualou ao controle quanto as porcentagens de células PIAIA, APM e MPI. A integridade acrossomal não sofreu efeito de nenhum tratamento utilizado.

Quanto à produção de ROS, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, provavelmente, porque o número de células contadas para esta análise tenha sido pequena. Se ela fosse aplicada com a técnica de citometria de fluxo, por exemplo, onde se conta uma quantidade muito maior de células por minuto, teríamos mais chances de tornar a nossa amostra mais próxima do real. Além disso, a questão do estresse oxidativo é extremamente discutível. A produção de pequenas quantidades de ROS é importante para o processo de capacitação, iniciando a cascata celular de interações com o oócito que culmina na fertilização (AITKEN; BAKER, 2004), sendo assim podemos dizer que elas não são prejudiciais aos espermatozoides quando estão em equilíbrio. Seu efeito prejudicial vem devido ao seu desequilíbrio, ou seja, alta produção de ROS, que pode ser devido à manipulação do sêmen para biotécnicas, por exemplo, sem ação adequada dos mecanismos antioxidantes presentes nas células e no plasma seminal, levando assim ao estresse oxidativo.

Em estudo publicado recentemente com sêmen in natura diluído de equinos, Gibb et al. (2014) encontraram resultados intrigantes. Paradoxalmente, houve correlações significativamente positivas ($P \leq 0.001$) entre uma série de parâmetros de motilidade (MT, RAP, VAP, VCL) e marcadores de estresse oxidativo (MSR positivos e 4HNE positivos). Estes resultados sugerem que os ejaculados mais férteis foram aqueles que apresentaram os mais altos níveis de estresse oxidativo. Uma possível explicação para essa relação pode ser que as populações de espermatozoides mais férteis são as que exibem os mais altos níveis de fosforilação oxidativa e estresse oxidativo, que são simplesmente subprodutos de uma intensa atividade mitocondrial. A análise de regressão mostrou que a geração de ROS medida em diferentes ensaios, demonstrou frequentemente uma correlação positiva com a fertilidade, ou, mais corretamente, que há uma relação inversa entre fertilidade e a porcentagem de

células sem danos oxidativos. Tais resultados demonstraram ainda mais que o estresse oxidativo deve ser considerado com cuidado em estudos sobre a fertilidade de garanhões.

Como resultados nas análises da morfologia espermática, tivemos que os tratamentos AF1,2mM, MEL 2mM e MEL 1 μ M apresentaram porcentagens de defeitos maiores inferiores ao controle. Dentro dos defeitos maiores, os que mais se diferenciaram foram gota protoplasmática proximal e cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa.

O número de espermatozoides normais pós-descongelção é significativamente diminuído principalmente pelos defeitos de cabeça e anormalidades na peça intermediária (O'CONNELL; MCCLURE; LEWIS, 2002). Em espermatozoides humanos, a gota protoplasmática é classificada como acúmulo de citoplasma residual como uma massa irregular em torno das mitocôndrias (peça intermediária), totalizando uma área de mais de um terço da cabeça do espermatozoide (de acordo com a Organização Mundial da Saúde, 1992). A retenção de citoplasma, principalmente na peça intermediária, está correlacionada com perda de motilidade e potencial fertilizante, devido ao aumento da produção de ROS nos espermatozoides com esse acúmulo (GOMEZ et al., 1996). Uma possível razão para esta associação é que a retenção do excesso de citoplasma residual está correlacionada com a presença de níveis relativamente elevados de enzimas citoplasmáticas (AITKEN et al., 2012).

Brouwers, Silva e Gadella (2005) constataram, através da sonda C11-BODIPY em microscopia confocal, que a maior parte do estresse oxidativo produzido pelo espermatozoide se localiza na peça intermediária, em menor proporção na parte posterior da cauda e é quase nulo na cabeça. Os autores também observaram que espermatozoides que possuem gotas citoplasmáticas apresentam alta peroxidação naquele local.

A melatonina, nas concentrações de 1mM e 2mM em espermatozoides de bovinos, também causou a diminuição de defeitos (GPP) durante a criopreservação, com relação ao controle (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013).

O fato de termos encontrado diminuição dos defeitos maiores com relação ao controle nos tratamentos AF1,2mM, MEL 2mM e MEL 1 μ M, podem estar ligados

com as afirmações citadas acima sobre o acúmulo de citoplasma na região da peça intermediária estar intimamente ligado com maiores níveis de produção de ROS. Porém, utilizando como base as análises feitas neste estudo, ainda não podemos afirmar o que levou a essa diminuição dos defeitos morfológicos gota protoplasmática proximal e cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa, sendo necessários mais estudos para definir este resultado. Na literatura, a maioria dos trabalhos se direcionam para tentar esclarecer como as ROS influenciam ou aumentam os defeitos, mas ainda faltam estudos sobre como os antioxidantes, agindo na diminuição das espécies reativas, podem diminuir os defeitos morfológicos.

4.5 CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados desta pesquisa, conclui-se que a melatonina, na concentração de 1 μ M, quando adicionada ao diluidor de congelação de sêmen equino, preserva melhor a função mitocondrial, sugerindo que ela pode otimizar a qualidade dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação.

Já a adição de ácido ferúlico não apresenta incremento à criopreservação do sêmen equino.

REFERÊNCIAS

AFFONSO, F. J. **Efeito do uso dos antioxidantes melatonina , ácido ferúlico e mioinositol sobre a motilidade , integridade de membranas e produção de espécies reativas de oxigênio em sêmen equino refrigerado**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2013.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 581–588, 2004.

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; GIBB, Z.; BAKER, M. A. The Simmet lecture: new horizons on an old landscape--oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47 Suppl 4, p. 7–14, 2012.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, n. 1, p. 257–265, 1993.

AITKEN, R. J.; LAMBOURNE, S.; GIBB, Z. The john hughes memorial lecture: Aspects of sperm physiology-oxidative stress and the functionality of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 1, p. 17–27, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2013.10.120>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

AITKEN, R. J.; SMITH, T. B.; LORD, T.; KUCZERA, L.; KOPPERS, a J.; NAUMOVSKI, N.; CONNAUGHTON, H.; BAKER, M. A.; DE IULIIS, G. N. On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. **Andrology**, v. 1, n. 2, p. 192–205, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316012>>. Acesso em: 12 nov. 2014.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence for Increased Lipid Peroxidative Damage and Loss of Superoxide Dismutase Activity as a Mode of Sublethal Cryodamage to Human Sperm During Cryopreservation. **journal of Andrology**, v. 13, n. 3, p. 232–241, 1992.

ALVES, M. R. B. **Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitaminaa ou laserterapia de baixa intensidade**. 2014. 166 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145–173, 1987.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (casa) e da morfometria (asma)**. 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2000.

ASHRAFI, I.; KOHRAM, H.; ARDABILI, F. F. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 139, n. 1-4, p. 25–30, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.016>>. Acesso em: 15 out. 2014.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 65–75, 2005.

BALAO DA SILVA, C. M.; MACÍAS-GARCÍA, B.; MIRÓ-MORÁN, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORILLO-RODRIGUEZ, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; STILWELL, G.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v. 51, p. 172–179, 2011a.

BALAO DA SILVA, C. M.; MACÍAS-GARCÍA, B.; MIRÓ-MORÁN, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORILLO-RODRIGUEZ, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; STILWELL, G.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 2, p. 172–179, 2011b.

BALL, B. A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 2, p. 259–269, 2002.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. C. G. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, 2000.

BRADFORD, L. L.; BUHR, M. M. Function of cryopreserved horse semen is improved by optimized thawing rates. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 22, p. 546–550, 2002.

BROUWERS, J. F.; SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. **Theriogenology**, v. 63, n. 2 SPEC. ISS., p. 458–469, 2005.

BUCAK, M. N.; ATEŞŞAHİN, A.; YÜCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v. 75, n. 2-3, p. 128–134, 2008.

BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIÖZKAN, S.; BAŞPINAR, N.; TAŞPINAR, M.; ÇOYAN, K.; BILGILI, A.; AKALIN, P. P.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; AYDOS, S.; ILGAZ, S.; SUNGUROĞLU, A.; ÖZTUNA, D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v. 61, n. 3, p. 248–253, 2010.

CARPENTIERI, A.; DÍAZ DE BARBOZA, G.; ARECO, V.; PERALTA LÓPEZ, M.; TOLOSA DE TALAMONI, N. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 4, p. 437–444, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.01.003>>. Acesso em: 08 set. 2014.

CASAO, A.; VEGA, S.; PALACÍN, I.; PÉREZ-PE, R.; LAVIÑA, A.; QUINTÍN, F. J.; SEVILLA, E.; ABECIA, J. A.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; FORCADA, F.; MUIÑO-BLANCO, T. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in rasa aragonesa rams. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 3, p. 425–432, 2010.

CEDIKOVA, M.; MIKLIKOVA, M.; STACHOVA, L.; GRUNDMANOVA, M.; TUMA, Z.; VETVICKA, V.; ZECH, N.; KRALICKOVA, M.; KUNCOVA, J. Effects of the Czech Propolis on Sperm Mitochondrial Function. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

CELEGHINI, E. C. C.; DE ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J. S.; DE ARRUDA, R. P. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1285–1292, 2010.

FAYER-HOSKEN, R. A.; CHRISTIAN, M. Improved techniques for freezing stallion semen as assessed by post-thaw parameters. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 1, p. 96–97, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2013.10.065>>. Acesso em: 04 dez. 2013.

FISCHER, T. W.; SLOMINSKI, A.; ZMIJEWSKI, M. A.; REITER, R. J.; PAUS, R. Melatonin as a major skin protectant: From free radical scavenging to DNA damage repair. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 713–730, 2008.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta: reviews on biomembranes**, v. 1469, n. 3, p. 197–235, 2000.

GIBB, Z.; LAMBOURNE, S. R.; AITKEN, R. J. The Paradoxical Relationship Between Stallion Fertility and Oxidative Stress. **Biology of Reproduction**, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25078685>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

GOMEZ, E.; BUCKINGHAM, D. W.; BRINDLE, J.; LANZAFAME, F.; STEWART-IRVINE, D.; AITKEN, R. J. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical

markers of the cytoplasmic space, oxidative stress and sperm function. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 276–287, 1996.

GRACIELA, Â.; MIRAGAYA, M. H.; COLENBRANDER, B.; AGU, A. Membrane changes during different stages of a freeze $\pm$ thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 59, p. 1693–1705, 2003.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, p. 435–448, 1992.

GRINBERG, Y. Y.; DIBBERN, M. E.; LEVASSEUR, V. a.; KRAIG, R. P. Insulin-like growth factor-1 abrogates microglial oxidative stress and TNF- α responses to spreading depression. **Journal of Neurochemistry**, v. 126, n. 5, p. 662–672, 2013.

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. 73–88, 1990.

HEITLAND, A. V.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K.; PICKETT, B. W.; HAMILTON, C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, n. 1, p. 47–53, 1996.

ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; NAKATA, C.; SAITO, Y.; OIKAWA, S.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; ISEKI, K. In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 466–471, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.073>>. Acesso em: 15 ago. 2014.

LA FALCI, V. S. N.; YRJÖ-KOSKINEN, A. E.; FAZELI, A.; HOLT, W. V.; WATSON, P. F. Antioxidant combinations are no more beneficial than individual components in combating ram sperm oxidative stress during storage at 5°C. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3-4, p. 180–187, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.12.006>>. Acesso em: 07 out. 2014.

LANZAFAME, F. M.; VIGNERA, S. L. A.; VICARI, E.; CALOGERO, A. E. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 19, n. 5, p. 638–659, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.09.014>>. Acesso em: 2 dez. 2014.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: From polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 3, p. 246–256, 1996.

LI, T. K. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 12, n. 5, p. 641–646, 1975.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 185–195, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.024>>. Acesso em: 03 dez. 2014.

MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLI, I.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; RODRIGUEZ, C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 59, n. 10, p. 1706–1713, 2002.

MISZTAL, T.; ROMANOWICZ, K.; BARCIKOWSKI, B. Melatonin--a modulator of the GnRH/LH axis in sheep. **Reproductive Biology**, v. 2, n. 3, p. 267–275, 2002.

MORRIS, G. J.; FASZER, K.; GREEN, J. E.; DRAPER, D.; GROUT, B. W. W.; FONSECA, F. Rapidly cooled horse spermatozoa: Loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. **Theriogenology**, v. 68, p. 804–812, 2007.

MORRIS, L. H. a; ALLEN, W. R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 1, p. 51–60, 2002.

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, 2006.

O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 17, n. 3, p. 704–709, 2002.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; JOHANNISSON, A.; PEÑA VEGA, F. J.; TAPIA, J. A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; DALIN, A. M.; MORRELL, J. M. Effect of Different Extenders and Seminal Plasma on the Susceptibility of Equine Spermatozoa to Lipid Peroxidation After Single-Layer Centrifugation, Through Androcoll-E. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 7, p. 411–416, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2011.01.010>>. Acesso em: 04 out. 2014.

PEÑA, F. J.; FERRUSOLA, C. O.; TAPIA, J. A.; APARICIO, I. M. How stallion sperm age in vitro? Scenario for preservation technologies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 451–454, 2012.

PEÑA, F. J.; MACÍAS GARCÍA, B.; SAMPER, J. C.; APARICIO, I. M.; TAPIA, J. A.; ORTEGA FERRUSOLA, C. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1177–1186, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.023>>. Acesso em: 05 out. 2014.

RAO, M. V.; GANGADHARAN, B. Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 935–942, 2008.

RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; ARRUDA, R. P. Effects of centrifugation on membrane integrity and lipid peroxidation of equine cooled spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 344-345, 2008. Trabalho apresentado no Proceedings of the 5th International Symposium on Stallion Reproduction, 2008.

REITER, R. J.; TAN, D.-X.; MANCHESTER, L. C.; PAREDES, S. D.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M. Melatonin and reproduction revisited. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 445–456, 2009.

ROCA, J.; GIL, M. A.; HERNANDEZ, M.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, 2004.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLI, I.; HERRERA, F.; MARTIN, V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes : a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, p. 1–9, 2004.

SANOKA, D.; MIESEL, R.; JEDRZEJCZAK, P.; KURPISZ, M. K. Oxidative stress and male infertility. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 449–454, 1996.

SARASWAT, S.; KHARCHE, S. D.; JINDAL, S. K. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 10, p. 247–255, 2014. Supplement, 1.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J.; QI, W. B.; KARBOWNIK, M.; CALVO, J. R. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. **Biological Signals and Receptors**, v. 9, n. 3-4, p. 137–159, 2000.

TRIMECHE, A.; YVON, J. M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, n. 1, p. 181–191, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00120-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00120-X)>. Acesso em: 04 out. 2014.

TUNCER, P. B.; BUCAK, M. N.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; SARIÖZKAN, S.; YENI, D.; EKEN, A.; AKALIN, P. P.; KINET, H.; AVDATEK, F.; FIDAN, A. F.; GÜNDOĞAN, M. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. **Cryobiology**, v. 61, n. 3, p. 303–307, 2010.

URBANIAK, A.; SZELAG, M.; MOLSKI, M. Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1012, p. 33–40, 2013.

VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, p. 16–24, 2014.

VIDAMENT, M.; DUPERE, A. M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 907–917, 1997.

WANG, H.; JOSEPH, J. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader¹¹Mention of a trade name, proprietary product, or specific equipment does not constitute a guarantee by the United States Department of Agriculture and does not imp. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 5-6, p. 612–616, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584999001070>>. Acesso em: 10 set. 2014.

ZHENG, R. L.; ZHANG, H. Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 4, p. 581–586, 1996.