Acervo - FMVZ 021374

ALESSANDRA CUNHA BRANDÃO

DEDALUS - Acervo - FMVZ

11300001459

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO GLICEROL E
ETILENOGLICOL E DO PROCESSO DE CONGELAÇÃO E
DESCONGELAÇÃO SOBRE O COMPLEXO DNA-PROTEINA
DE ESPERMATOZÓIDES EM GARANHÕES**

Dissertação apresentada para obtenção do
Título de Mestre junto à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. José Antônio Visintin

T.1045
FMVZ
ex.1

São Paulo

2001

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

Brandão, Alessandra Cunha

Avaliação da influência do glicerol e etilenoglicol e do processo de congelação e descongelação sobre o complexo DNA proteína de espermatozóides em garanhões / Alessandra Cunha Brandão.

52 f. : il.

Dissertação (mestrado em Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2001.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Visintin.

Unitermos: 1.Garanhões. 2.Cromatina. 3.Sêmen. 4.DNA. 5.Protaminas. 6.Crioprotetores.

Aos Agradecimentos:

Aos amigos e familiares que sempre estiveram ao meu lado em todas as etapas da minha vida, especialmente os meus pais, por serem a minha base e a minha inspiração.

Aos professores que me ensinaram a importância da educação e a perseverança, especialmente o meu professor de matemática, Sr. João, por me ensinar a lidar com os desafios.

Aos colegas de turma que tornaram a minha jornada mais divertida e produtiva, especialmente os meus amigos do time de futebol, por sempre estarem comigo.

Aos meus professores de inglês, especialmente o Sr. Carlos, por me ensinar a importância da comunicação e da cultura estrangeira.

Aos meus professores de história, especialmente o Sr. Roberto, por me ensinar a importância da nossa história e da nossa cultura.

Aos meus professores de arte, especialmente o Sr. João, por me ensinar a importância da criatividade e da expressão artística.

Aos meus professores de ciências, especialmente o Sr. Roberto, por me ensinar a importância da observação e da experimentação.

Aos meus professores de português, especialmente o Sr. Roberto, por me ensinar a importância da linguagem e da comunicação.

Aos meus professores de matemática, especialmente o Sr. Roberto, por me ensinar a importância da lógica e da resolução de problemas.

**AOS CAVALOS
POR SUA EXISTÊNCIA SUBLIME.**

Aos meus professores de filosofia, especialmente o Sr. Roberto, por me ensinar a importância da reflexão e da busca pela verdade.

Acervo - FMVZ 021374

Meus Agradecimentos:

Ao amigo Prof. Dr. José Antônio Visintin, por acreditar em meus propósitos com relação ao mestrado, e ainda, ter proporcionado condições para sua realização.

Ao amigo Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, pelos ensinamentos e acompanhamento durante a realização da minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ed Hoffman Madureira, por várias oportunidades oferecidas em toda minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabé, pela oportunidade e confiança para realização de mais esta etapa.

Ao Prof. Dr. Wilson Gonçalves Vianna, pelo auxílio ao meu ingresso no mestrado.

Ao amigo Prof. Dr. Mário Binelli, por estar presente tantas vezes.

Aos amigos de Pirassununga: Alexandre Marques, João Gustavo P. Loureiro, Maria Fernanda P. Loureiro, Eneiva Carla C. Celeghini, Norma Lúcia de Souza, Luiz Augusto de Castro e Paula pela ajuda e companherismo.

Aos amigos de São Paulo: Marco Roberto B. de Mello, Mayra Elena O. D. Assunção, Alecsandra S. de Lima, Liliam M. T. Tavares, Vanessa Magnusson e a todos que colaboraram de alguma forma.

Ao Prof. João Junqueira Fleury e esposa, pelo auxílio e concessão dos animais.

Ao Amarildo e Edna, Haras Beltran, pela hospitalidade e concessão dos animais.

Ao Prof. João Flávio P. Martins, pela contribuição na elaboração do projeto de pesquisa.

Aos amigos Adauto R. Filho, Roberto Porto Filho, Manoel C. L. Netto pela constante disponibilidade em ajudar.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio L. C. da Silva, por aceitar o convite em participar da banca de mestrado.

A minha querida mãe, que mesmo distante, manteve constante incentivo e inebriante doçura.

Ao meu querido pai, pelo apoio profissional e momentos alegres proporcionados por seu infinito bom humor.

A minha família como um todo (avó, tios, irmão e primos), por estarem sempre ao meu lado na luta pelo sucesso.

Ao meu querido e companheiro primo Marcelo Martins da Cunha "Lelo" (*in memoriam*), por tantas alegrias e por existir, mesmo que pouco, em minha vida.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio concedido através da bolsa de mestrado, processo 99/12090-5.

BRANDÃO, A.C. Avaliação da influência do glicerol e etilenoglicol e do processo de congelação e descongelação sobre o complexo DNA-proteína de espermatozóides em garanhões. [Evaluation of influence of glycerol and ethylene glycol and process of freezing and thawing for complex DNA-protein of stallion spermatozoa.] São Paulo, 2001. 52 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Foi estudado a influência das estações não reprodutiva e reprodutiva, dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol e do processo de congelação e descongelação sobre a motilidade, o vigor, a morfologia e o complexo DNA-proteína de espermatozóides em garanhões, comparando o sêmen fresco, o exposto a congelação e descongelação sem crioprotetores, o exposto aos crioprotetores sem congelação e o exposto aos crioprotetores com congelação e descongelação. Foram utilizados seis garanhões da raça Mangalarga Paulista, colhendo 12 ejaculados de cada animal na estação não reprodutiva (1) e 12 ejaculados na estação reprodutiva (2), analisando a motilidade, o vigor, a concentração, a morfologia e a patologia do complexo DNA-Proteína. A patologia do complexo DNA-Proteína foi avaliada em sêmen fixado com etanol-ácido-acético glacial 3:1 (v/v), tratado com HCL 4N a 25°C e corado com azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine, empregando microscopia óptica com aumento de 1000x. Os resultados mostraram que a motilidade, o vigor, a morfologia e a anomalia do complexo DNA-Proteína dos espermatozóides diferem entre os grupos congelado e não congelado ($P < 0,05$). Para o grupo fresco, a taxa de patologia do complexo DNA-Proteína apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre as estações 1 e 2. O processo de congelação e descongelação exerce influência negativa sobre o complexo DNA-Proteína de espermatozóides em garanhões.

Unitermos: Garanhão, Cromatina, Sêmen, Crioprotetores, DNA, protamina.

BRANDÃO, A.C. Evaluation of influence of glycerol and ethylene glycol and process of freezing and thawing for complex DNA-protein of stallion spermatozoa. [Avaliação da influência do glicerol e etilenoglicol e do processo de congelação e descongelação sobre o complexo DNA-proteína de espermatozóides em garanhões.] São Paulo, 2001. 52 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

To study the effects of freezing and thawing on DNA-protein complexes in spermatozoa, 12 ejaculate were collected from each of 6 stallions (Mangalarga Paulista breed) in each of two consecutive breeding seasons. Motility, vigor, concentration, morphology and incidence of the DNA-protein complex pathologies of spermatozoa were evaluated and compared among fresh semen, semen expose to freezing and thawing without cryoprotectants and semen exposed to the cryoprotectors glycerol and ethylene glycol left at room temperature or frozen. Incidence of the DNA-protein complex pathologies was evaluated in semen smear fixed in na ethanol-acetic-acid mixture (3:1, v/v) for 1 minute, washed in 70% ethanol for 3 minutes and air dried. To induce nuclear metachromasy, smears were treated with 4N HCL at 25°t for 20 minutes followed by rinsing in distilled water. Preparation were stained with a 0.025% toluidine blue solution in Mailvaine buffer for 15 minutes. Frequency of spermatozoa exhibiting nuclear metachromasy was determined in 1000 cells/animal by light microscopy at 1000X magnification. Motility, vigor, morphology and DNA-protein complex pathologies of spermatozoa were different for semen frozen compared to not frozen ($P<0.05$). For fresh semen, there were effects of seasons on the incidence of DNA-protein complex pathologies ($P<0.05$) For semen frozen without cryoprotectants there were significant effects seasons ($P<0.05$) The process of cryopreservation and thawing influences negatively the DNA-protein complexes in stallion spermatozoa.

Uniterms: Stallion, Chromatin, Semen, Cryoprotectants, DNA, protamine.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
3 MATERIAL E MÉTODO	20
3.1 LOCAL E PERÍODO DO EXPERIMENTO	20
3.2 ANIMAIS	20
3.3 COLHEITA DE SÊMEN	20
3.4 TRATAMENTO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
3.4.1 Sêmen fresco	21
3.4.2 Sêmen exposto a congelação e descongelação sem crioprotetores	22
3.4.3 Sêmen exposto aos crioprotetores sem congelação	22
3.4.4 Sêmen exposto aos crioprotetores com congelação e descongelação	23
3.4.5 Avaliação do complexo DNA-Proteína	24
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4 RESULTADOS	27
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÕES	40
7 REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	50

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A partir da constatação da possibilidade de congelar células espermáticas, muitos estudos foram realizadas para melhorar as técnicas de inseminação artificial e manejo reprodutivo das espécies animais.

O sêmen eqüino, para ser congelado e oferecer resultados satisfatórios, deve ser conservado em diluidor que provenha capacidade de proteção e ausência de toxicidade aos espermatozóides, visto que grande parte do estresse celular ocorre durante a congelação e a descongelação.

Em centrais de inseminação artificial, os animais são avaliados andrologicamente, analisando os ejaculados quanto a motilidade, o vigor, a concentração e a morfologia dos espermatozóides.

No entanto, estudos sobre a maturação de espermatozóides mostraram a possibilidade de ocorrer defeitos durante a compactação do DNA nuclear, resultando em alterações de fertilidade, sem que haja necessariamente modificações de motilidade e de vigor dos espermatozóides.

A compactação do DNA dos espermatozóides envolve fenômenos moleculares como a substituição de proteínas histônicas, que estão ligadas ao DNA das células somáticas, por outra proteína denominada protamina que irá promover a condensação do DNA (Figs. 1 e 2)

Vários métodos foram desenvolvidos para estudar a interação da protamina com o DNA, citando a microespectrofotometria com ultravioleta; a coloração com reação de Feulgen e os corantes catiônicos como o alaranjado de acridina, o verde metila e o azul de toluidina.

Estas técnicas, que permitem a constatação de anomalia do material nuclear de espermatozóides, vem sendo estudadas para serem aplicadas em exame de rotina nas centrais de inseminação artificial, preconizando praticidade, baixo custo e avaliação precisa dos reprodutores.

O presente trabalho objetivou avaliar a influência das estações não reprodutiva e reprodutiva, dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol e do processo de congelação e descongelação sobre a motilidade, o vigor, a morfologia e o complexo DNA-proteína de espermatozóides em garanhões, comparando o sêmen fresco (controle 1), o exposto a congelação e descongelação sem crioprotetores (controle 2), o exposto aos crioprotetores sem congelação e o exposto aos crioprotetores com congelação e descongelação.

Fonte: ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3rd ed. New York: Garland, 1994. p. 342.

Figura 1 – Disposição das histonas na fita de DNA

Fonte: BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **Journal Cell Biology**, v. 93, p. 303, 1982.

Figura 2 – Representação da protamina em volta da molécula de DNA, promovendo a sua compactação.

REVISTA DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A criobiologia aplicada à conservação de sêmen foi iniciada por SMITH e POLGE (1950) que relataram o efeito crioprotetor do glicerol na sobrevivência espermática, após a congelação dos espermatozóides de várias espécies a -79°C . Em seguida foi demonstrado que o sêmen diluído em gema de ovo-citrato, adicionado de glicerol e conservado a -79°C pelo período de até 32 semanas (POLGE e ROWSON, 1952) ou um ano (ROWSON e POLGE, 1953) mantinha a capacidade fecundante, resultando em taxas de concepção de 69% e 65%, respectivamente. Posteriormente, mereceu considerável atenção o uso do nitrogênio líquido para congelação, demonstrando que a motilidade progressiva mantinha-se mais elevada no sêmen conservado a -196°C do que a -79°C (BEAN et al., 1963 e SULLIVAN e MIXNER, 1963).

Atualmente, a criopreservação de sêmen é uma prática amplamente difundida e explorada na medicina reprodutiva das espécies que, aliada às técnicas de inseminação artificial, vem contribuindo eficazmente em diversas áreas, como a reprodução das espécies selvagens (HOWARD et al., 1986 e ROTT, 1995) e o melhoramento genético de várias espécies animais de grande interesse comercial e/ou científico, como bovinos e eqüinos. Segundo GRAHAM (1996), entre 1950 e 1980 a produção diária do rebanho leiteiro dos E.U.A. passou de 26.000 kg de leite/vaca/ano para 52.000 kg de leite/vaca/ano, após a utilização de sêmen de reprodutores com grande potencial genético para produção de leite e que essa melhoria não seria possível em apenas 30 anos sem o uso de sêmen congelado.

O sêmen congelado de eqüinos não foi amplamente difundido devido a eficiência e a difusão da técnica ter tido pouco progresso quando comparada à espécie bovina (HEITLAND, et. al., 1996). Recentemente, muitas associações de raças de eqüinos têm permitido o uso da inseminação artificial com espermatozóides criopreservados. Isto tem renovado o interesse pela técnica por proprietários, médicos veterinários e associações de criadores (ARRUDA, 2000). Desde então, trabalhos usando diferentes técnicas de colheita, diluidores, armazenamentos e métodos de congelação tem mostrado taxas de concepção aceitáveis com sêmen congelado em garanhões. Porém, algumas pesquisas revelaram considerável variação entre garanhões, no que se refere à sobrevivência dos espermatozóides congelados e descongelados (BOYLE, 1996).

ARRUDA et al. (1993) congelaram sêmen de eqüinos em palhetas com 0,5 ml e concentração de 250 milhões de espermatozóides, apresentando 35 a 45% de motilidade progressiva após a descongelação. Verificaram a eficiência da inseminação artificial com um aplicador que deposita no corpo do útero o conteúdo de duas palhetas ao mesmo tempo. Foram inseminadas 45 éguas com idades entre 3 e 18 anos, resultando 62,07% (18) de prenhez no 1º estro, 13,79% (4) no 2º e 24,14% (7) no 3º. Apesar do pequeno número de fêmeas, os resultados foram satisfatórios com esta técnica de inseminação artificial.

TISCHNER (1979) relatou que somente 20% dos garanhões apresentaram boa taxa de sobrevivência dos espermatozóides pós congelação e descongelação.

A criopreservação requer muitas etapas (diluidor, centrifugação, refrigeração, congelação, descongelação e inseminação artificial) que interativamente podem afetar o sucesso da congelação. O progresso da criopreservação de sêmen de garanhões é dependente dos defeitos que ocorrem nos espermatozóides em cada etapa do processo (HEITLAND et. al., 1996).

Diluidores usados para criopreservação de espermatozóides de garanhões, usualmente contém gema de ovo, açúcares, eletrólitos e glicerol, variando a concentração dos componentes de acordo com cada protocolo. Lipídeos, lipoproteínas e outros aditivos que previne o “choque frio” e defeitos de refrigeração durante a criopreservação também têm sido adicionados (HEITLAND et. al., 1996).

A centrifugação é uma etapa indispensável para o processo da congelação e tem como função eliminar o plasma seminal que é deletério à célula espermática e promover a sedimentação dos espermatozóides. A centrifugação normalmente não é prejudicial aos espermatozóides e seu efeito pode ser ainda minimizado com a utilização de diluidores específicos e de baixa força de centrifugação 400 g (JASKO, 1994). Centrifugações entre 370 g e 829 g não produziram efeitos deletérios sobre os espermatozóides (PICKETT et. al., 1975).

Durante o resfriamento, os espermatozóides submetidos a variação brusca de temperatura podem sofrer alterações pouco compreendidas e parcialmente irreversíveis, principalmente entre 18° e 8° C (AMANN e PICKETT, 1987).

O termo “choque frio” define algumas alterações que ocorrem nos espermatozóides quando submetidos ao resfriamento rápido entre 20°C e 4°C, acarretando alterações bioquímicas nos espermatozóides e diminuições irreversíveis na motilidade espermática. Isto inclui diminuição na glicólise e respiração celular, aumento da degeneração do DNA e liberação intracelular de enzimas e lipídeos (JASKO, 1994).

BURN e REASNER (1995) pesquisaram o efeito da adição de glicerol em diferentes concentrações (0%, 1%, 2%, 3% e 4%) na criopreservação dos espermatozóides de eqüinos. Foram utilizados 6 ejaculados de 3 garanhões, que foram diluídos em glicose-sacarose-leite desnatado e armazenados em nitrogênio líquido por no máximo 30 dias. Após descongelação e ressuspensão, cada amostra de sêmen foi avaliada quanto a motilidade espermática total, progressiva e linear e os desvios laterais de cabeça pelo sistema computadorizado. Os resultados mostraram que a concentração ótima de glicerol foi de 2% por apresentar melhor crioproteção e menor efeito deletério.

MERCANTE et. al. (1995) avaliaram a eficiência do etilenoglicol e do glicerol a 5% *in vitro* como crioprotetores. Após análise da motilidade e vigor pós descongelação, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, entretanto, constatou-se tendência de melhor performance do etilenoglicol tanto na motilidade como no vigor.

ARRUDA (2000) analisou os efeitos de diferentes diluidores e crioprotetores (glicerol e etilenoglicol) sobre o sêmen de eqüinos, avaliando a motilidade por análise computadorizada (CASA); a viabilidade espermática e a integridade do acrossomo por sondas fluorecentes em microscopia e em citometria de fluxo; a morfometria da cabeça do espermatozóide por análise computadorizada (ASMA). Foi observado que o diluidor "A" (MARTIN, 1979) apresentou melhores resultados com glicerol, o "B" (INRA 82 modificado de PALMER, 1984) mostrou semelhança entre o glicerol e o etilenoglicol e o "C" (leite desnatado, modificado de BURNS e FLEMING, 1988) apresentou forte tendência de superioridade com etilenoglicol.

Sendo assim, a avaliação da viabilidade espermática pós descongelação vem merecendo estudos tanto *in vivo*, observando as taxas de prenhez (SILVA et al., 1987 e GASTAL et al., 1991) quanto *in vitro* (TAO et al., 1995 e HEITLAND et al., 1996), avaliando novos crioprotetores e protocolos de congelação (FISER e FAIRFULL, 1990 e BRAUN et al., 1995), pois grande parte do estresse celular ocorre na congelação com formação de cristais de gelo e na dissolução destes cristais na descongelação, causando estresse osmótico que prejudica a viabilidade espermática (WATSON, 1995; WILHELM et al., 1996).

A avaliação *in vitro* da viabilidade espermática pós-descongelção é realizada por exames que determinam a motilidade, a morfologia do acrossomo (JOHNSON et al., 1981); a concentração extracelular de enzimas, o teste de termoresistência (LARSON e ERSMAR, 1980) e o teste de turgidez em condições hipo-osmótica (TAKAHASHI et al., 1990 e YAVETS et al., 1995).

A morfologia espermática é de grande importância para avaliação do sêmen, sendo usados diferentes sistemas de classificação dos espermatozóides em ganhões. Em alguns destes sistemas, as células espermáticas são classificadas de acordo com a origem das anormalidades, divididos em defeitos primários, que são originados durante a espermatogênese e defeitos secundários, que aparecem após a espermatogênese (BIELANSKI, 1975 e DOTT, 1975).

A consequência mais grave de deterioração da qualidade espermática durante o armazenamento é o decréscimo da fertilidade sem que haja necessariamente decréscimo da motilidade dos espermatozóides. Dentre as mudanças estruturais causadas pela congelação, menciona-se as lesões de membrana plasmática e de acrossomo, bem como a liberação de enzimas pelos espermatozóides. Lesões nucleares e mitocondriais determinam o escoamento de fosfolípidios, proteínas intracelulares e mitocôndrias dos espermatozóides (MANN e LUTWAK-MANN, 1981; LARSSON, 1980; BEORLEGUI et al., 1995 e BRAUN et al., 1995).

Os maiores fatores de infertilidade em machos são o estresse oxidativo e a deleção do cromossomo Y. A maior causa do estresse oxidativo é o aparecimento de alta taxa de reação do oxigênio com retenção excessiva do citoplasma na peça intermediária dos espermatozóides. Outras possíveis causas, incluem depleção antioxidante e apoptose. Recombinações aberrantes, defeitos na compactação da cromatina, apoptose abortiva e estresse oxidativo podem estar envolvidos na etiologia de defeitos no DNA da linha germinativa. O fator responsável pela deleção do cromossomo Y nos espermatozóides continua sem solução em centrais de reprodução, assim como o controle do estresse oxidativo sofrido pelas células germinativas durante sua diferenciação e maturação no trato reprodutivo (AITKEN e KRAUSZ, 2001).

A condensação do material nuclear é um importante evento na diferenciação celular durante a espermatogênese. Nos mamíferos, o DNA nuclear, que em células somáticas estaria ligado a proteínas nucleares básicas chamadas histonas, passa a formar complexos íntimos com outros tipos de proteínas nucleares básicas conhecidas como protaminas queratinosas ou “protamine-like” (BLOCH, 1969 e OLIVA e DIXON, 1991).

A protamina é uma sequência de aminoácidos ricos em arginina e alguns resíduos de cisteína, responsáveis pela compactação do DNA dos espermatozóides, formando um complexo condensado de DNA-Proteína. Em algumas espécies de mamíferos (bovinos e suínos), o núcleo dos espermatozóides contém um único tipo de protamina, P1-protamina, com forte homologia entre as espécies. Um segundo tipo de protamina, P2-protamina, está presente em núcleos

de espermatozóides de outros mamíferos, incluindo homens, camundongos e garanhões (PIRHONEN et al., 1994).

A cromatina difusa, característica presente nas células mais jovens da linhagem germinativa, torna-se altamente condensada e bioquimicamente inerte nos últimos estágios da espermiogênese (WAGNER e MINHAS, 1982). Concomitante a estas alterações, as histonas ricas em lisina são descomplexadas do DNA e substituídas ou acrescidas pelas protaminas queratinosas que são ricas em arginina, mas também, contêm muitos resíduos de cisteína, os quais formam pontes disulfeto entre as moléculas proteicas adjacentes durante os estágios finais da maturação cromatínica, promovendo interações entre tais moléculas ao redor da hélice de DNA (BALHORN, 1982).

As moléculas de protamina ligam-se aos grupos fosfatos presentes no sulco menor da fita de DNA, neutralizando as cadeias de fosfodiéster e eliminando a repulsão eletrostática normal entre segmentos vizinhos do DNA. Com isso, o sulco menor de uma fita de DNA interage com o sulco maior da fita de DNA adjacente, promovendo íntima compactação molecular. O complexo DNA-protamina é mais estável em relação a desnaturação térmica e a outras formas do que o complexo DNA-histona (BALHORN, 1982 e GLEDHILL et al., 1966).

Existem evidências de que este processo de condensação do DNA possa ser parcial, resultando no complexo DNA-proteína menos estável e aumentando a susceptibilidade à desnaturação (GLEDHILL et al., 1966). Há ainda sugestão de que esta alteração possa ser causada por defeito na ligação entre os grupos fosfatos do DNA às proteínas nucleares ou por ocorrência de tipo anormal ou desconhecido de proteína ligada ao DNA (GLEDHILL et al., 1966; MELLO, 1982).

Alterações nos testículos causadas por variações de temperatura podem induzir mudanças na estrutura cromatínica espermática, resultando em DNA espermático mais suscetível à desnaturação ácida. O grau de mudança no DNA pode ser mensurado em ensaio que avalia a estrutura cromatínica espermática (SCSA). O SCSA mensura a relação entre as fitas simples e as duplas de DNA após coloração com o corante metacromático, laranja acridina. KENNEY e LOVE (1999) usaram garanhões para estudar o efeito do estresse térmico escrotal sobre o DNA espermático. Mudanças no SCSA foram correlacionadas com pontes dissulfeto, assim como tipos e níveis de protamina, indicando que a suscetibilidade de desnaturação do DNA foi dependente do estágio de desenvolvimento dos espermatozóides ejaculados durante o período de estresse pelo calor. Espermatozóides com alterações no DNA, apresentaram decréscimo nas extensões das pontes dissulfeto, as quais foram associadas com aumento da suscetibilidade de desnaturação do DNA, porém, não foi detectado mudanças no tipo e níveis de protamina.

Estudo de BENCH et. al. (1996) mensurou a emissão de partículas induzidas por raio-X (PIXE) visando quantificar massas de fósforo e de enxofre dentro do núcleo de espermatozóides de touros, garanhões, hamster, ratos e humanos clinicamente férteis. O enxofre pôde determinar a protamina total (protamina 1 e protamina 2), enquanto o fósforo determina a massa de DNA contida no núcleo espermático de cada espécie. Os resultados revelam que a proporção relativa de protamina 1 e protamina 2 varia entre as espécies, mas a protamina total em relação ao DNA espermático é similar em touros, garanhões, hamster e ratos. Em contraste, o núcleo de espermatozóide maduro em humanos apresenta

conteúdo significativamente baixo de protamina, sugerindo que mais de 15% do DNA de espermatozóides humanos permanecem compactados pelas histonas.

Alterações no complexo DNA-Proteína dos espermatozóides de mamíferos vem sendo sugeridas como importantes causas de subfertilidade em várias espécies como bovinos (GLEDHILL et al., 1966; BARTH e OKO, 1989 e BELETTI e MELLO, 1996), leporinos (BELETTI e MELLO, 1995) e humanos (COSTA e BELETTI, 1995 e COSTA et al., 1996).

MARTINS (1997) analisou se o tempo de criopreservação do sêmen de touros causaria alterações no complexo DNA-Proteína, na motilidade e no vigor. Avaliaram-se 42 partidas de sêmen congelado em ampolas de vidro e em palhetas plásticas nos anos de 1973 a 1995. Observou-se que a anomalia do complexo DNA-Proteína foi mais elevada nos anos 1973 e 1974, quando o sêmen foi armazenado em ampolas de vidro. Houve diminuição nas taxas de motilidade e de vigor em função do aumento do tempo de criopreservação, independente do tipo de embalagem. Não foi observado correlação entre incidência de patologia do complexo DNA-Proteína e tempo de criopreservação.

GLEDHILL (1966) acredita que o complexo DNA-proteína imaturo, ou seja, com defeitos nas ligações das proteínas nucleares aos grupos fosfatos, interfere na penetração normal e na ativação do oócito pelo espermatozóide.

O complexo DNA-Proteína anômalo não é detectado em exames rotineiros que empregam esfregaços de sêmen sem coloração e microscópio óptico, nem tampouco pela análise morfológica dos espermatozóides.

Várias metodologias vem sendo estudadas para detecção deste tipo de anomalia, como a microespectrofotometria com ultravioleta (GLEDHILL et al., 1966); a coloração com reação de Feulgen (GLEDHILL et al., 1966 e BRITTO et al., 1988) e os corantes catiônicos como alaranjado de acridina (GLEDHILL et al., 1966; EVENSON, 1980 e DARZYNKIEWICZ, 1990), verde metila (GLEDHILL et al., 1966) e azul de toluidina (MELLO, 1977, 1982). Na reação de Feulgen, os espermatozóides possuidores do complexo DNA-Proteína normal são corados homogeneamente em tom vermelho púrpuro. No entanto, as células com alteração no complexo DNA-Proteína evidenciam aumento localizado ou generalizado da coloração nuclear, atribuído a deficiência cromatínica ou defeitos na ligação de proteínas nucleares aos grupos fosfatos do DNA, que afetariam a cinética de hidrólise do DNA, tornando-os mais rapidamente acessíveis à depurinação e, portanto, fazendo com que os núcleos aparecessem mais rapidamente “coráveis” do que os núcleos normais (GLEDHILL, 1970).

Estudo de BRITTO et. al. (1988), com touro sem raça definida, adotou o conteúdo Feulgen-DNA e áreas nucleares determinadas em espectrofotometria de varredura automática para espermatozóides com morfologia normal. Comprovou-se os valores Feulgen-DNA dos animais portadores de espermatozóides com baixos níveis de anomalias morfológicas (50% da amostragem), alguns exibindo quadro de oligozoospermia (20% da amostragem). Dos animais desaconselhados como doadores de sêmen, com base no percentual elevado de espermatozóides com anomalias morfológicas, parte apresentou valores Feulgen-DNA de 11,2 a 14,3% abaixo da média. Sugere que se deva às alterações no complexo DNA-Proteína desses espermatozóides e não às perdas de DNA por aneuploidia. A subfertilidade

admitida para os animais restantes não pode ser determinada com a reação de Feulgen. Esta reação mostrou-se aconselhável para discriminar subfertilidade em touros sem raça definida apenas quando acompanhada por avaliações com outras metodologias.

MELLO (1977) desenvolveu o método denominado de "metacromasia induzida" para identificar alterações no complexo DNA-proteína em espermatozóides de touros. Este método consta da coloração de azul de toluidina precedida por tratamento ácido (HCL 4N a 25°C, 15 a 20 minutos.). Os espermatozóides normais se coram em verde, pois poucos grupos fosfatos do DNA estariam disponíveis para ligação com o corante catiônico. Contudo, aqueles com anomalia no complexo DNA-Proteína, se corariam em violeta (metacromasia), uma vez que muitos grupos fosfatos seqüenciais estariam acessíveis no DNA, permitindo maior interação com as moléculas do corante (MELLO, 1982). A metacromasia induzida pode também ser exibida pelo complexo DNA-Proteína anômalo em espermatozóides, quando a coloração com azul de toluidina é precedida por outros tipos de tratamentos como 2-mercaptoetanol-uréia, NaCl e solução SSC (BELETTI, 1992 e BELETTI e MELLO, 1996).

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 LOCAL E PERÍODO DO EXPERIMENTO

O experimento foi desenvolvido no Haras Beltran situado na cidade de Espírito Santo do Pinhal-SP e no Haras JO (José Osvaldo) na cidade de São José do Rio Pardo-SP, durante o período de maio a julho de 2000 e setembro a novembro de 2000.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados seis garanhões da raça Mangalarga, entre 4 e 10 anos de idade, sendo quatro animais pertencentes ao Haras Beltran e dois ao Haras JO.

3.3 COLHEITA DE SÊMEN

Foram realizadas vinte e quatro colheitas de cada animal, uma vez por semana, sendo 12 colheitas de maio a julho de 2000 (estação não reprodutiva - 1) e 12 colheitas de setembro a novembro de 2000 (estação reprodutiva - 2), utilizando-se vagina artificial modelo Botucatu (PAPA et. al. 1987), com auxílio de uma égua em cio. Imediatamente após às colheitas, realizaram-se os exames macro e microscópico dos ejaculados.

3.4 TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi utilizado o delineamento em 6 blocos casualizados com arranjo fatorial de tratamento do tipo 3 X 2, adicionados do fator medidas repetidas no tempo.

3.4.1 - Sêmen fresco (controle 1 –T1)

Avaliação do quadro espermático pela análise da motilidade, do vigor, da concentração e da morfologia, assim como da patologia do complexo DNA- Proteína em amostras de sêmen fresco.

As avaliações da motilidade e do vigor dos espermatozóides foram realizadas entre lâmina e lamínula em platina aquecida a 37°C sob microscopia óptica, com aumento de 200x.

A concentração espermática foi determinada em câmara de Neubauer, na diluição de 1:100 com formol salino (2 ml de formol salino tamponado e 20 ul de sêmen).

Para a morfologia, os espermatozóides foram fixados em formol salino e avaliados entre lâmina e lamínula em microscópio de contraste de fase, com aumento de 1000x.

3.4.2 – Sêmen exposto a congelação e descongelação sem crioprotetores (controle 2 – T2)

Avaliação da motilidade, do vigor, da morfologia e da patologia do complexo DNA-Proteína em amostras de sêmen congelado em palhetas de 0,5 ml sem crioprotetores.

3.4.3 – Sêmen exposto aos crioprotetores sem congelação

Avaliação da motilidade, do vigor, da morfologia e da patologia do complexo DNA-Proteína em amostras de sêmen exposto aos crioprotetores glicerol e etilenoglicol sem congelação.

O ejaculado, após avaliação, foi acrescido de igual volume de diluidor à base de EDTA-glicose (MARTIN et al., 1979; Anexo 1) e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos (JASKO et al., 1992). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento dividido em duas alíquotas de igual volume:

1- Ressuspensão em diluidor à base de EDTA-gema de ovo-lactose, contendo 5% de glicerol (MARTIN et al., 1979; Anexo 2, T3)

2- Ressuspensão em diluidor à base de EDTA-gema de ovo-lactose, contendo 5% de etilenoglicol (Anexo 3, T4)

O sêmen, após diluição, foi mantido em banho-maria a 37°C por 10 minutos.

3.4.4 - Sêmen exposto aos crioprotetores com congelação e descongelação

Avaliação da motilidade, do vigor, da morfologia e da patologia do complexo DNA-proteína, após o processo de congelação e descongelação com glicerol ou etilenoglicol.

O ejaculado foi diluído, centrifugado e ressuspenso em diluidor contendo glicerol (T5) ou etilenoglicol (T6), conforme o procedimento do item 3.4.3.

A ressuspensão foi feita de modo que a concentração alcançasse 200×10^6 espermatozóides/ml. O sêmen diluído foi envasado em palhetas plásticas de 0,5 ml, identificadas com os códigos do garanhão, da colheita e dos crioprotetores.

Após o envase, as palhetas foram submetidas ao vapor de nitrogênio, a 3 cm da superfície da coluna líquida por 10 minutos, sendo imersas e armazenadas no nitrogênio líquido a -196°C .

A descongelação do sêmen foi feita por imersão das palhetas em água a 37°C por 30 segundos.

3.4.5 Avaliação do complexo DNA-proteína

A patologia do complexo DNA-proteína foi avaliada em esfregaços de sêmen de acordo com MELLO (1982) e BELETTI (1992). O material foi fixado em etanol-ácido-acético glacial 3:1 (v/v) por 1 minuto e em álcool 70% por 3 minutos.

Como pré-tratamento indutor da metacromasia, o esfregaço foi tratado com ácido clorídrico 4N a 25°C por 20 minutos e, em seguida, lavado em água destilada. Este tratamento faz com que sejam rompidas as ligações proteicas menos estáveis dos espermatozóides que possuem o complexo DNA-proteína anômalo.

A coloração foi feita com azul de toluidina a 0,025% em tampão McILvaine por 15 minutos (Anexo 4).

O princípio da basofilia no complexo DNA-proteína corado com azul de toluidina (AT) se baseia na disponibilidade e proximidade de grupos fosfatos do DNA não ligados à protamina, aptos a se ligarem às moléculas do corante. Se o DNA apresentar poucos grupos fosfatos não ligados à proteína e distantes entre si, a coloração apresentará tonalidade verde (espermatozóides normais). Se, no entanto, o DNA apresentar muitos grupos fosfatos não ligados à proteína e próximos entre si, muitas moléculas de azul de toluidina se ligarão em sequência no DNA, apresentando coloração violeta, o que representa expressão do fenômeno denominado de metacromasia (BELETTI e MELLO, 1996), como mostra a fig. 3.

O complexo DNA-proteína foi avaliado em 1000 espermatozóides, utilizando a microscopia óptica com aumento de 1000x.

Fonte: BELETTI, M. E. **Anomalias em complexo DNA-proteína de espermatozóides de touro:** contribuição metodológica. 1992.84 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Figura 3 - Representação do fenômeno da metacromasia induzida

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das médias e seus respectivos desvios padrões foram apresentados em tabelas e gráficos. Para as análises estatísticas, os valores em percentagem foram transformados em arco-seno. Todas as análises foram realizadas com o programa Stat-View® pertencente ao SAS Institute, Inc. 1998. Os efeitos das estações não reprodutiva e reprodutiva, dos crioprotetores, do processo congelação e descongelação e das respectivas interações foram avaliados pela análise de variância (ANOVA). Quando o principal efeito foi significativo, as médias foram comparadas individualmente pelo teste de Fisher. A hipótese testada foi considerada significativa quando $P < 0.05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

Os resultados da pesquisa foram analisados e os dados foram apresentados em forma de gráficos e tabelas. Os dados foram coletados durante o período de observação e foram analisados de acordo com os objetivos da pesquisa.

Os dados foram coletados durante o período de observação e foram analisados de acordo com os objetivos da pesquisa. Os resultados foram apresentados em forma de gráficos e tabelas.

Os dados foram coletados durante o período de observação e foram analisados de acordo com os objetivos da pesquisa. Os resultados foram apresentados em forma de gráficos e tabelas.

Os dados foram coletados durante o período de observação e foram analisados de acordo com os objetivos da pesquisa. Os resultados foram apresentados em forma de gráficos e tabelas.

Os dados foram coletados durante o período de observação e foram analisados de acordo com os objetivos da pesquisa. Os resultados foram apresentados em forma de gráficos e tabelas.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

As imagens da resposta metacromática dos espermatozóides de garanhões, evidenciando o complexo DNA-Proteína anômalo, são mostradas na fig. 4.

Figura 4 – Espermatozóides corados pela técnica da metacromasia induzida (A, B e C), evidenciando anomalia do complexo DNA-Proteína (seta).

Aumento 1000x.

Os valores médios e os desvios padrões da motilidade, vigor, morfologia e patologia do complexo DNA-Proteína nos diferentes tratamentos e nas estações não reprodutiva (1) e reprodutiva (2) estão nas tabelas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Os gráficos 1, 2, 3 e 4 demonstram os valores médios e os desvios padrões da motilidade, vigor, morfologia e patologia do complexo DNA-Proteína nos diferentes tratamentos.

TABELA 1 -Valores médios e desvios padrões da motilidade (%) dos espermatozóides eqüinos submetidos a diferentes tratamentos, nas estações não reprodutiva (1) e reprodutiva (2), São Paulo, 2001.

TRATAMENTO	ESTAÇÃO 1	ESTAÇÃO 2
F	65,76 ± 19,69 ^{a, A}	63,95 ± 11,38 ^{a, A}
FGL	62,33 ± 25,61 ^{a, A}	61,11 ± 17,24 ^{a, A}
FET	59,26 ± 25,59 ^{a, A}	63,40 ± 15,21 ^{a, B}
CGL	34,50 ± 22,27 ^{b, A}	22,02 ± 12,03 ^{b, B}
CET	26,19 ± 19,32 ^{c, A}	18,01 ± 12,28 ^{b, B}
CF	1,01 ± 1,13 ^{d, A}	0,88 ± 4,10 ^{c, A}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

F= Sêmen fresco (T1)

FGL= Sêmen fresco diluído em glicerol (T2)

FET= Sêmen fresco diluído em etilenoglicol (T3)

CGL= Sêmen congelado em glicerol(T4)

CET= Sêmen congelado em etilenoglicol (T5)

CF= Sêmen fresco congelado sem crioprotetor (T6)

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) para a motilidade nos tratamentos exposto ao crioprotetor (etilenoglicol) sem congelação e nos congelados com crioprotetores entre as estações 1 e 2. Entre os tratamentos na mesma estação, houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos congelados e não congelados.

Gráfico 1—Valores médios e desvios padrões da motilidade dos espermatozóides eqüinos submetidos a diferentes tratamentos, São Paulo, 2001.

Letras diferentes sobre barras diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

F= Sêmen fresco (T1)

FGL= Sêmen fresco diluído em glicerol (T2)

FET= Sêmen fresco diluído em etilenoglicol (T3)

CGL= Sêmen congelado em glicerol (T4)

CET= Sêmen congelado em etilenoglicol (T5)

CF= Sêmen fresco congelado sem crioprotetor (T6)

Tabela 2 - Valores médios e desvios padrões do vigor (1-5) dos espermatozóides eqüinos submetidos a diferentes tratamentos nas estações não reprodutiva (1) e reprodutiva (2), São Paulo, 2001.

TRATAMENTO	ESTAÇÃO 1	ESTAÇÃO 2
F	3,34 ± 0,65 ^{a, A}	3,11 ± 0,51 ^{a, B}
FGL	3,23 ± 0,79 ^{a, b, A}	3,15 ± 0,62 ^{a, A}
FET	3,00 ± 0,83 ^{b, A}	3,19 ± 0,57 ^{a, B}
CGL	2,44 ± 0,85 ^{c, A}	1,95 ± 0,68 ^{b, B}
CET	2,13 ± 0,86 ^{d, A}	1,70 ± 0,77 ^{c, B}
CF	0,83 ± 0,62 ^{e, A}	0,45 ± 0,60 ^{d, B}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

F= Sêmen fresco (T1)

FGL= Sêmen fresco diluído em glicerol (T2)

FET= Sêmen fresco diluído em etilenoglicol (T3)

CGL= Sêmen congelado em glicerol (T4)

CET= Sêmen congelado em etilenoglicol (T5)

CF= Sêmen fresco congelado sem crioprotetor (T6)

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) para o vigor nos diferentes tratamentos entre as estações 1 e 2, exceto o tratamento exposto ao crioprotetor glicerol. Entre os tratamentos na mesma estação, houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos congelados e não congelados. Os tratamentos não congelados na estação 2, não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre si.

Gráfico 2 - Valores médios e desvios padrões do vigor dos espermatozóides eqüinos submetidos a diferentes tratamentos, São Paulo, 2001.

Letras diferentes sobre barras diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

F= Sêmen fresco (T1)

FGL= Sêmen fresco diluído em glicerol (T2)

FET= Sêmen fresco diluído em etilenoglicol (T3)

CGL= Sêmen congelado em glicerol (T4)

CET= Sêmen congelado em etilenoglicol (T5)

CF= Sêmen fresco congelado sem crioprotetor (T6)

Tabela 3 - Valores médios e desvio padrões da morfologia (%) dos espermatozóides eqüinos submetidos a diferentes tratamentos nas estações não reprodutiva (1) e reprodutiva (2), São Paulo, 2001.

TRATAMENTO	ESTAÇÃO 1	ESTAÇÃO 2
F	32,54 ± 16,98 ^{b,A}	21,01 ± 8,57 ^{c, B}
FGL	34,20 ± 15,91 ^{b, A}	24,56 ± 9,42 ^{c,d, B}
FET	34,36 ± 15,99 ^{b, A}	25,95 ± 9,09 ^{d, B}
CGL	42,75 ± 16,32 ^{a, A}	39,52 ± 12,79 ^{b, B}
CET	42,18 ± 16,79 ^{a, A}	39,37 ± 12,69 ^{b, B}
CF	46,84 ± 18,10 ^{a, A}	45,76 ± 15,21 ^{a, A}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

F= Sêmen fresco (T1)

FGL= Sêmen fresco diluído em glicerol (T2)

FET= Sêmen fresco diluído em etilenoglicol (T3)

CGL= Sêmen congelado em glicerol (T4)

CET= Sêmen congelado em etilenoglicol (T5)

CF= Sêmen fresco congelado sem crioprotetor (T6)

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) para a morfologia nos diferentes tratamentos entre as estações 1 e 2, exceto o tratamento congelado sem crioprotetor. Entre os tratamentos na mesma estação, houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos congelados e não congelados.

Gráfico 3 – Valores médios e desvios padrões da morfologia dos espermatozóides eqüinos submetidos a diferentes tratamentos. São Paulo, 2001.

Letras diferentes sobre barras diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

F= Sêmen fresco (T1)

FGL= Sêmen fresco diluído em glicerol (T2)

FET= Sêmen fresco diluído em etilenoglicol (T3)

CGL= Sêmen congelado em glicerol (T4)

CET= Sêmen congelado em etilenoglicol (T5)

CF= Sêmen fresco congelado sem crioprotetor (T6)

Tabela 4 - Valores médios e desvios padrões da patologia do complexo DNA-Proteína (%) dos espermatozóides eqüinos submetidos a diferentes tratamentos nas estações não reprodutiva (1) e reprodutiva (2).

São Paulo, 2001

TRATAMENTO	ESTAÇÃO 1	ESTAÇÃO 2
F	15,35 ± 7,92 ^{b, A}	13,72 ± 3,84 ^{d, B}
FGL	16,55 ± 6,97 ^{b, A}	16,52 ± 3,69 ^{c, A}
FET	16,86 ± 6,84 ^{b, A}	16,45 ± 3,83 ^{c, A}
CGL	29,15 ± 13,58 ^{a, A}	30,19 ± 4,21 ^{a, A}
CET	31,45 ± 13,25 ^{a, A}	30,74 ± 4,19 ^{a, A}
CF	31,79 ± 11,32 ^{a, A}	27,46 ± 4,42 ^{b, B}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (P < 0,05).

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P < 0,05).

F= Sêmen fresco (T1)

FGL= Sêmen fresco diluído em glicerol (T2)

FET= Sêmen fresco diluído em etilenoglicol (T3)

CGL= Sêmen congelado em glicerol (T4)

CET= Sêmen congelado em etilenoglicol (T5)

CF= Sêmen fresco congelado sem crioprotetor (T6)

Houve diferença significativa (P<0,05) para o complexo DNA-Proteína nos tratamentos congelado sem crioprotetor e fresco entre as estações 1 e 2. Os tratamentos congelados diferiram significativamente (P<0,05) dos tratamentos não congelados, dentro da mesma estação.

Gráfico 4 - Valores médios e desvios padrões da patologia do complexo DNA-Proteína dos espermatozóides eqüinos submetidos a diferentes tratamentos. São Paulo, 2001.

Letras diferentes sobre barras diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

F= Sêmen fresco (T1)

FGL= Sêmen fresco diluído em glicerol (T2)

FET= Sêmen fresco diluído em etilenoglicol (T3)

CGL= Sêmen congelado em glicerol (T4)

CET= Sêmen congelado em etilenoglicol (T5)

CF= Sêmen fresco congelado sem crioprotetor (T6)

Os resultados mostraram que a anomalia do complexo DNA-Proteína, o vigor, a motilidade e a morfologia dos espermatozóides diferem entre os grupos congelados e não congelados ($P < 0,05$).

O sêmen sem congelação diferiu significativamente ($P < 0,05$) do sêmen congelado em todos os tratamentos.

5 DISCUSSÃO

Devido ao crescente uso de sêmen congelado, muitos estudos foram elaborados para determinar o potencial de fertilidade do reprodutor, tanto que a congelamento e descongelamento causam danos aos espermatozoides (1983-2000) pesquisa indica que a congelamento causa danos negativos tanto as células espermáticas (MANN e PICKETT, 1997).

Estudos para determinar a qualidade espermática, integridade do material genético nuclear, integridade das células (JOHNSON et al., 1993).

Em 1997, estudos indicam que a descongelamento causa alterações de integridade nuclear e integridade espermática, indicando mudanças na estrutura e integridade do material genético nuclear. O DNA pode ser afetado a descongelamento (KENNEY e LOVE, 1990). Com isso, o processo de descongelamento pode provocar aumento de células com DNA-Proteína alterada.

Em 1997, estudos indicam que o processo de descongelamento e descongelamento causa danos ao material genético nuclear e integridade das células (JOHNSON et al., 1993).

Em 1997, estudos indicam que o processo de descongelamento e descongelamento causa danos ao material genético nuclear e integridade das células (JOHNSON et al., 1993).

DISCUSSÃO

Em 1997, estudos indicam que o processo de descongelamento e descongelamento causa danos ao material genético nuclear e integridade das células (JOHNSON et al., 1993).

5 DISCUSSÃO

Devido ao freqüente uso de sêmen congelado, vários estudos foram elaborados para determinar o potencial de fertilidade do reprodutor. Visto que a congelação e descongelação causam danos aos espermatozóides, têm-se pesquisado técnicas de congelação com menores efeitos negativos sobre as células espermáticas (AMANN e PICKETT, 1987).

Técnicas para determinar a viabilidade espermática, integridade do acrossomo e defeitos nucleares têm sido estudadas (JOHNSON et. al., 1981).

Problemas ocorridos durante a espermatogênese, como variações de temperatura e traumas testiculares, podem induzir mudanças na estrutura cromatínica dos espermatozóides, resultando em DNA mais susceptível a desnaturação ácida (KENNEY e LOVE, 1999). Com isso, o processo de criopreservação têm provocado aumento de células com DNA-Proteína desnaturado.

O presente trabalho estudou o processo de congelação e descongelação, utilizando o glicerol e o etilenoglicol como crioprotetores, sobre o DNA-Proteína de espermatozóides em garanhões.

Os resultados mostraram que a motilidade, o vigor, a morfologia e a anomalia do complexo DNA-Proteína dos espermatozóides diferem entre os grupos congelados e não congelados ($P < 0,05$).

A anomalia do complexo DNA-Proteína identificado pelo método da metacromasia induzida, está em função do número e da proximidade de grupos fosfatos disponíveis no DNA para ligação com moléculas de azul de toluidina

(MELLO, 1982). Sendo assim, os espermatozóides com anomalia do complexo DNA-Proteína se coram em violeta (metacromasia). Os resultados do presente trabalho mostram núcleos metacromáticos em todos os tratamentos congelados e não congelados com diferentes crioprotetores (glicerol e etilenoglicol).

Durante o processo de condensação do DNA espermático, há evidências de que este processo pode ser parcial, tornando este complexo DNA-Proteína menos estável e mais susceptível a desnaturação (GLEDHILL, et. al., 1966). Neste caso, durante o processo de congelação e descongelação, as ligações protéicas do DNA menos estáveis, passam a tornar esta célula inviável para fecundação. No presente estudo, verificou-se que durante o processo de congelação e descongelação, havia aumento no número de células espermáticas com alterações do complexo DNA-Proteína em relação às não congeladas, independente do crioprotetor.

MARTINS (1997), estudando o complexo DNA-Proteína, o vigor e a motilidade de espermatozóides de touros submetidos a diferentes tempos de criopreservação, observou que não possui correlação entre o tempo de criopreservação e a incidência de patologia do complexo DNA-Proteína. Mas no presente estudo, observou-se que a motilidade e o vigor foram reduzidos e significativos ($P < 0,05$) no sêmen congelado, independente do crioprotetor. Quanto ao complexo DNA-Proteína, constatou-se aumento significativo ($P < 0,05$) após a congelação e descongelação. Para verificar se o tempo de congelação influencia ou não o aumento da patologia do complexo DNA-Proteína é necessário armazenar o sêmen em nitrogênio líquido por alguns anos e refazer o estudo para comparação.

MERCANTE et al. (1995) avaliaram a eficiência do etilenoglicol e do glicerol a 5% *in vitro* como crioprotetores, observando que para a motilidade e o vigor, o etilenoglicol teve melhor performance. Já no presente estudo, o etilenoglicol mostrou ser mais deletério ao complexo DNA-Proteína, mas manteve igual performance em relação ao glicerol para a motilidade e o vigor.

ARRUDA et. al. (1993) utilizaram sêmen de garanhões com motilidade progressiva de 35 a 45% após descongelação, obtendo boas taxas de prenhez. No presente estudo foi encontrado de 15 a 55% de motilidade progressiva após a descongelação do sêmen congelado com glicerol e de 10 a 45% com etilenoglicol.

BURNS e REASNER (1995) estudaram o efeito do glicerol em diferentes concentrações (0%, 1%, 2%, 3% e 4%) na criopreservação dos espermatozóides de eqüinos, observando que a concentração de 2% apresentou melhor crioproteção e menor efeito deletério. No presente estudo empregou concentração fixa de 5% de glicerol e de etilenoglicol, observando que o glicerol foi menos deletério para o espermatozóide do que o etilenoglicol.

AMANN e PICKETT (1987) consideraram que durante o resfriamento, os espermatozóides sofrem alterações parcialmente irreversíveis e pouco compreendidas. Quanto às alterações morfológicas neste trabalho, as células congeladas apresentaram maiores taxas de anormalidades do que as não congeladas, independente do crioprotetor. Com relação a motilidade, estimada pela relação de espermatozóides vivos e mortos e ao vigor, estimado pela intensidade de movimentação retilínea progressiva dos espermatozóides, percebe-se que o processo de criopreservação não só eleva a concentração de células mortas, como também influencia na qualidade do movimento dos espermatozóides, devido a

mudanças estruturais decorrentes de lesões da membrana plasmática, acrossomo e membranas intracelulares, causadas pela formação de cristais de gelo dentro da célula durante a congelação e aumento pela recristalização durante o processo de descongelação.

Neste trabalho, ao estudar a influência da estação reprodutiva, pode-se observar diferenças significativas ($P < 0,05$) na motilidade, no vigor, na patologia morfológica e no complexo DNA-Proteína dos espermatozóides nos diferentes tratamentos.

Existem várias técnicas para analisar o complexo DNA-Proteína dos espermatozóides, mas devem ser aprimoradas para uso rotineiro em exames de avaliação da capacidade reprodutiva dos animais.

Para a criopreservação do sêmen, deve-se fazer a avaliação da fertilidade do reprodutor, pois o processo de congelação e descongelação influencia diretamente a capacidade fecundante dos espermatozóides.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Este trabalho permite concluir que:

- 1 - O processo de enovelamento ocorre inicialmente sobre a molécula de RNA, a morfologia do complexo DNA-Proteína sendo alterada durante o processo;
- 2 - O citocri é menor, mais compacto e com o espermatozóide do que o citocri de abelha, devido a estas diferenças a morfologia do complexo é diferente;
- 3 - A interação e penetração do citocri no DNA ocorre numa diferença entre os dois citocri, sendo que o citocri de abelha penetra mais facilmente na molécula de DNA, devido à sua estrutura de citocri mais compacta;
- 4 - Os citocri congelados sem qualquer alteração no aumento significativo da penetração do complexo DNA-Proteína em relação ao citocri de abelha.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Este trabalho permite concluir que:

1 – O processo de criopreservação exerce influência negativa sobre a motilidade, o vigor, a morfologia e o complexo DNA-Proteína, independente do crioprotetor.

2 – O glicerol é menos deletério para o espermatozóide do que o etilenoglicol em relação ao complexo DNA-Proteína.

3 - Em relação a patologia do complexo DNA-Proteína, houve diferença entre as estações não reprodutiva e reprodutiva para os tratamentos frescos com e sem congelação, na ausência de crioprotetor.

4 – O sêmen congelado sem crioprotetor não apresentou aumento significativo de patologia do complexo DNA-Proteína em relação ao sêmen congelado com crioprotetores.

REFERÊNCIAS

- _____

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, p. 497-506, 2001.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3rd ed. New York: Garland, 1994. p. 342.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 f. Tese de (Livre-Docência em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ARRUDA, R. P.; BARNABÉ, V. H.; VIEIRA, R. C.; BARBOSA, R. T.; BARNABÉ, R. C.; VISINTIN, J. A. Inseminação artificial com sêmen de eqüinos acondicionados em palhetas de 0,5ml. Utilização de um aplicador de sêmen para duas dose. CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10., Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993. p.260.
- BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **Journal Cell Biology**, v. 93, p. 298-305, 1982.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State Press, 1989. v 1, p. 152-156.

BEAN, B. H.; PIC'KETT, B. W.; MARTIG, R. C. Influence of freezing methods, extenders, and storage temperatures on motility and pH of frozen bovine semen. **Journal. Dairy Science.**, v. 46, p. 145-149, 1963.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Influência da temperatura testicular sobre o complexo DNA-proteína em espermatozóides de coelho. **Revista Brasileira de Genética**. v. 18, p. 131, 1995. Suplemento.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 1, p. 97-103, 1996.

BELETTI, M. E. **Anomalias em complexo DNA-proteína de espermatozóides de touro: contribuição metodológica**. 1992.84 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BEORLEGUI, N. B.; CORDOBA, M.; BECONI, M. T. Mitochondrial calcium uptake in bovine frozen sperm. **Biochemistry and Molecular Biology International**. v. 35, n. 4, p. 713-718, 1995.

BIELANSKI, W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. **Journal Reproduction Fertility**. v. 23, p. 19-24, 1975. Supplement.

BLOCH, D. P. A catalog of sperm histones. **Genetics**, v. 61, p. 93-111, 1969. Supplement.

BRITTO, C. M. C.; MELLO, M. L. S. Induced nuclear metachromasy evaluated in spermatozoa of "Pé-duro" bulls. **Revista Brasileira Genética**. v. 11, p. 349-354, 1988.

BRAUN, J.; HOCHI, S.; OGURI, N.; SATO, K.; TORRES BOGGINO, F. Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen/thawed stallion spermatozoa. **Cryobiology**, v. 32, n. 5, p. 482-492, 1995.

COSTA, E. N.; BELETTI, M. E. Uso da metacromasia induzida na detecção de anomalias ao nível de complexo DNA-proteína em espermatozóides humanos. **Revista Brasileira Genética**, v. 18, p. 567, 1995.

COSTA, E. N.; BELETTI, M. E.; SOUSA, M. C. N.; RESENDE, E. V. The anomalous DNA protein complex in human -,spermatozoa of varicocele cases. **Brazilian Journal Genetics**. v. 19, n. 3, p. 147, 1996. Supplement.

DARZYNKIEWICZ, Z. Differential staining- of DNA and RNA in intact cell and isolated cell nuclei with acridine orange. **Methodology Cell Biology**, v. 33, p. 285-298, 1990.

DOTT, H. M. Morphology of stallion spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v. 23, p. 41-46, 1975, Supplement.

EMMENS, C. W.; BLACKSHAW, A. W. The low temperature storage of ram, bull and rabbit spermatozoa. **Australian Veterinary Journal**, v. 26, p. 226-228, 1950.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z. & MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar - spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, n. 2, p. 123-129, 1990.

GASTAL, E. L.; HENRY, M.; GASTAL, M. O.; COUTINHO, A. Fertilidade do sêmen de dois garanhões com diferentes motilidades e concentrações espermáticas pós-descongelamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 15, n. 3/4, p. 179-189, 1991.

GLEDHILL, B. L.; GLEDHILL, M. P.; RIGLER Jr, R.; RINGERTZ, N. R. Atypical changes of desoxyribonucleoprotein during spermiogenesis associated with a case of infertility in bull. **Journal Reproduction Fertility**, v. 12, p. 575-578, 1966.

GLEDHILL, B. L. Changes in nuclear stainability associated with spermateliosis, spermatozoal maturation, and male infertility. In: WIED, G. L.; BAHR, G.F. (Ed.) **Introduction to quantitative citochemistry- II**. New York: Academic-Press, 1970. p. 125-151.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 131-147, 1996.

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

HOWARD, J. G.; BUSH, M.; DE VOS, V.; SCHIEWE, M. C.; PURSEL, V. G.; WILDT, D. E. Influence of crioprotective diluent on post-thaw viability and acrosomal integrity of spermatozoa of the African elephant (*Loxodonta africana*) **Journal Reproduction Fertility**, v. 78, n. 1, p. 295-306, 1986.

JOHNSON, L. A.; ALBERS, J. G.; WILLENS, C. M. T. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in cows on 36 farms. **Journal Animal Science**, v. 52, p. 1130-1136, 1981.

JOHNSON, M. S.; SENGHER, P. L.; ALLEN, C. H.; HANCOCK, D. D.; ALEXANDER, B. M.; SASSER, R. G. Fertility of bull semen packaged in. 25- and.5-milliliter French straws. **Journal Animal Science**, v. 73, n. 7, p. 1914-1919, 1995.

LARSON, K.; ERSMAR, M. Laboratory studies on frozen: thawed boar semen in relation to contemporary fertility with liquid semen in AI boars. **Zuchthygiene**, v. 15, p. 111-117, 1980.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. 495 p.

MARTIN, J. C.; KLUG, W.; GUNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 47-51, 1979. Supplement.

MARTINS, J. F. P. **Comportamento do complexo DNA-Proteína, do vigor e da motilidade de espermatozóides de touros submetidos a diferentes tempos de congelação**. 1997. 42 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Instituto de Biologia-Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MELLO, M. L. S. DNP variants in morphologically normal spermatozoa. CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE GENÉTICA, 3., 1977, Montevideu. **Resumos...**, p.250.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v. 74, p. 387-392, 1982.

OLIVA, R.; DIXON, G. H. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. **Program Nuclear Acid Research Molecular Biology**, v. 40, p. 25-94, 1991.

POLGE, C.; ROWSON, L. E. A. Results with bull semen stored at -79°C. **Veterinary Record**, v. 4, n. 3, p. 851, 1952.

ROTT, N. N. The creation of genetic cryobanks and the use of the methods of developmental biology as a means for preserving rare animal species. I. The cryopreservation of the sperm of wild mammals. **Ontogenez**, v. 26, n. 4, p. 270-281, 1995.

ROWSON, L. E. A.; POLGE, C. Storage of bull semen at -79°C and fertility results up to 12 month. **Veterinary Record**, v. 65, p. 677-679, 1953.

SAS Institute. **SAS user's guide: statistics**. 5th ed. Cary-NC: SAS Institute, 1985. 288p

SILVA, C. A. M.; FARIAS, N. D.; NOGUEIRA, C. E. W.; ALDA, I. L. Inseminação artificial em eqüinos com sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 11, n. 2, p. 95-101, 1987.

SULLIVAN, J. J.; MIXNER, J. P. Effects of method of egg yolk addition and of glycerol equilibration time upon post thawing motility and metabolic activity of frozen bull semen. **Journal Dairy Science**, v. 46, p. 463-467, 1963.

TAKAHASHI, K.; UCHIDA, A. & KITAO. M. Hypoosmotic swelling test of sperm. **Archives of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 225-242, 1990.

TAO, J.; DU, J.; KLEINHANS, F. W.; CRITSER, E. S.; MAZUR, P.; CRITSER J. K. The effect of collection temperature, cooling rate and warming rate on chilling injury and cryopreservation of mouse spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v. 104, n. 2, p. 231-236, 1995.

WAGNER, T. E.; MINHAS, B. S. Condensation and descondensation of spermatozoa DNA. In: Amman, R. P., Seidel, G. E (Ed.). **Prospects for sexing mammalian sperm**. Colorado Associated Press, Boulder: 1982. p. 49-60

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility Development**, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 33, n. 3, p. 320-329, 1996.

YAVETZ, H.; HAUSER, R.; YOGEV, L.; BOTCHAN, A.; LESSING, J. B.; HOMONNAL, Z. T.; PAZ, G. Advanced methods for evaluation of sperm quality. **Andrologia**, v. 27, n. 1, p. 31-35, 1995.

ANEXOS

SERVIÇO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

ANEXOS

Anexo 1

Receita para a suspensão (MARTIN, et al., 1979)

Clorfeniramina	6,0g
2-Prato	0,370g
Clorfeniramina	0,375g
Benzilato de sódio	0,120g
Propileno	0,000g
Penicilina	50 UI
Água Destilada (q.s.p.)	100 ml

Anexo 2

Receita para a suspensão - glicerol (MARTIN, et al., 1979)

Lactose 1%	50 ml
Distilado para a suspensão	20 ml
Gema de ovo	20 ml
Equex (Cirrus e f.o.)	12 ml
Glicerol	30 ml

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1

Diluidor para centrifugação (MARTIN *et al.*, 1979)

Glicose	6,0g
EDTA.....	0,370g
Citrato de Sódio.....	0,375g
Bicarbonato de Sódio	0,120g
Streptomicina	0,050g
Penicilina.....	50 UI
Água Destilada Estéril (q.s.p.).....	100 ml

Anexo 2

Diluidor para congelação - glicerol (MARTIN *et al.*, 1979)

Lactose 11%	50 ml
Diluidor para centrifugação.....	25 ml
Gema de ovo	20 ml
Equex (<i>Orvus est paste</i>)	0,8 ml
Glicerol	5,0 ml

Anexo 3**Diluidor para congelação - etilenoglicol (MARTIN et al.,1979)**

Lactose 11%.....	50 ml
Diluidor para centrifugação.....	25 ml
Gema de ovo.....	20 ml
Equex (<i>Orvus est paste</i>)	0,8 ml
Etilenoglicol.....	5,0 ml

Anexo 4**Avaliação do complexo DNA-proteína****Solução I**

Etanol-ácido-acético glacial 3:1	500 ml
--	--------

Solução II

Álcool 70%	500 ml
------------------	--------

Solução III

Ácido clorídrico(HCL) 4N.....	500 ml
-------------------------------	--------

Solução IV - Tampão McIlvaine ph 4.0

Solução A - Solução de ácido cítrico 0.1M (19,21 g/1000 ml de água destilada)

Solução B - solução de fosfato dibásico de sódio (53,65gr de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou 71,7g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ em 1000 ml de água destilada).

Tampão McIlvaine

Solução A.....30,7 ml

Solução B.....19,3 ml

Água destilada qsp.....100ml

Solução V

Azul de toluidina.....25mg

Tampão McIlvaine qsp.....100 ml