



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
NÍVEL MESTRADO**

**Efeito de antioxidantes aos espermatozóides de eqüinos
submetidos ao estresse térmico.**

Aline França Dias Oliveira

Prof^ª. Dra. Lídia Andreu Guillo

(Orientadora)

Goiânia

2010

Aline França Dias Oliveira

Efeito de antioxidantes aos espermatozóides de eqüinos submetidos ao estresse térmico.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Lúdia Andreu Guillo

Goiânia

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

GPT/BC/UFG

Oliveira, Aline França Dias.

O482e Efeito de antioxidantes aos espermatozoides de equinos submetidos ao estresse térmico [manuscrito] / Aline França Dias Oliveira. - 2010.

xvi, 76 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lídia Andreu Guillo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras e tabelas.

1. Cisteína. 2. Glutathione. 3. Laranja de acridina. 4. Espermatozóide. 7. Equino – Garanhão. I. Título.

CDU: 636.1:577.15

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Orientadora: Prof^a. Dra. Lúdia Andreu Guillo

Laboratório de Laboratório de Bioquímica Celular.

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

1º Examinador: Prof. Dr. Carlos Estrela

Departamento de Odontologia.

Universidade Federal de Goiás.

2º Examinador: Prof^a. Dra. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos

Laboratório do Setor de Reprodução.

Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás.

Suplentes

1º Examinador: Prof^a. Dra. Rosália dos Santos Amorin Jesuíno

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

2º Examinador: Prof. Dr. Reginaldo Nassar

Médico Veterinário, professor no Instituto de Ciências Biológicas.

Universidade Federal de Goiás.

DEDICO

Aos meus pais **Olair** e **Benedito**! Pela educação que me deram, por todo amor e carinho dedicados a mim. Pelo apoio em todos os momentos da minha vida.
Eu amo vocês.

“Pai!
Pode ser que daqui a algum tempo
Haja tempo prá gente ser mais
Muito mais que dois grandes amigos
Pai e filho talvez...

Pai!
Pode ser que daí você sinta
Qualquer coisa entre
Esses vinte ou trinta
Longos anos em busca de paz...

Pai!
Pode crer, eu tô bem
Eu vou indo
Tô tentando, vivendo e pedindo
Com loucura pra você renascer...

Pai!
Eu não faço questão de ser tudo
Só não quero e não vou ficar mudo
Pra falar de amor
Pra você...

Pai!
Senta aqui que o jantar tá na mesa
Fala um pouco tua voz tá tão presa
Nos ensine esse jogo da vida
Onde a vida só paga pra ver...

Pai!
Me perdoa essa insegurança
Que eu não sou mais
Aquele criança
Que um dia morrendo de medo
Nos teus braços você fez segredo
Nos teus passos você foi mais eu...

Pai!
Eu cresci e não houve outro jeito
Quero só recostar no teu peito
Prá pedir prá você ir lá em casa
E brincar de vovô com meu filho
No tapete da sala de estar
Ah! Ah! Ah!...

Pai!
Você foi meu herói meu bandido
Hoje é mais
Muito mais que um amigo
Nem você nem ninguém tá sozinho
Você faz parte desse caminho
Que hoje eu sigo em paz
Pai! Paz!...”

Fábio Júnior

“Mãe...
Não importa cor ou credo...
Rica ou pobre...
Mãe é sempre mãe...

Sempre presente
Na dor, na doença, na alegria,
Em cada momento da nossa vida
Lá está ela já com algo em mente

Mãe querida, amada, sofrida...
Ignora as discriminações da sociedade
Em prol do seu amor e se preciso for
Da a sua própria vida

Esquece-se de si mesma
Por desejar a vitória do filho
E ao vibrar com as vitórias alcançadas
Nem se lembra de seu próprio mérito

Mãe é como uma flor...
É carinho, cuidado, proteção,
Compreensão, doação, perdão...
Mãe resume tudo o que é amor!

Mãe é a própria canção de amor,
Tocada suavemente em nossos corações...

Agradeço a você mãe
Todo o amor por minha vida!”

Star (2004)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que sempre me guia e ilumina todos os meus passos, e muito me ajudou na conclusão desse trabalho. A **Nossa Senhora**, que sempre nos ilumina e intercede por nós.

A Prof^ª. Dra. **Lídia Andreu Guillo**, pela forma atenciosa que me acolheu como sua orientanda. Serei sempre grata pelos seus ensinamentos e pela maneira que a senhora sempre me tratou, com atenção e carinho, e me orientando da melhor maneira possível.

A Prof^ª. Dra. **Maria Lúcia Gambarini**, pela ajuda, dedicação, sugestões e ensinamentos que sempre levarei comigo.

Ao Prof. Dr. **Cirano José Ulhôa**, pela compreensão, apoio e ajuda sempre que me foi necessário. E também a todos do seu Laboratório de Enzimologia, que sempre me trataram bem, ajudaram quando possível.

Aos colegas **Adriane Gambôa, Bárbara Dumas, Martina Freire, Renata Prado e Eduardo Fernandes**, pela amizade, por terem estado ao meu lado, no momento do mestrado, me incentivando e apoiando.

A minha psicóloga **Dra. Terezinha M. Cunha**, que tanto me ajudou a persistir e concluir esse trabalho, apesar dos problemas.

Ao colega **Rodrigo Arruda**, que tanto me ensinou e ajudou no desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pela ajuda, companheirismo e ensinamentos, os quais sem eu não teria chegado até aqui.

A **Débora Cristina**, do Laboratório de Bioquímica Celular, que foi uma grande companheira e sempre me ajudou, com boa vontade, em tudo que precisei. E também aos demais colegas desse laboratório que me trataram bem.

Aos estagiários do setor de reprodução da Escola de Veterinária, pela ajuda durante a realização dos experimentos.

Ao meu noivo, **Leandro Silva Souza**, por todo seu amor e carinho. E por ter me apoiado e incentivado durante esse trabalho, e em tantos momentos da nossa vida!

Ao meu irmão, **Vitor França Dias Oliveira**, que sei que torce por mim.

A todos que de alguma maneira me ajudaram e contribuíram para a realização desse trabalho.

E, por último, mas não menos importante, agradeço aos meus **pais**! Obrigada por todo apoio e carinho durante essa etapa. Foi difícil, mas consegui porque vocês estiveram ao meu lado. Foram muitos os momentos difíceis, mas vocês nunca me deixaram desistir. Obrigada. Mamãe, obrigada pelo seu amor, e incentivo. E... papai, não tenho nem palavras para expressar meu agradecimento e orgulho por você. Sem você, eu

não teria chegado até aqui, você sabe! Sinto muito orgulho disso e me lembrarei sempre dessa fase que vivemos juntos. Muito obrigada!

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	17
2-REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1-Biologia do espermatozóide.....	20
2.2-Papel das espécies reativas de oxigênio (ROS).....	22
2.3- Crioinjúrias espermáticas e o papel de antioxidantes.....	26
2.4-Técnicas de detecção de alterações na integridade espermática.....	30
<i>2.4.1-Avaliação da membrana plasmática.....</i>	<i>31</i>
<i>2.4.2-Avaliação da membrana acrossomal.....</i>	<i>32</i>
<i>2.4.3-Avaliação da integridade da cromatina do DNA.....</i>	<i>34</i>
<i>2.4.4-Avaliação da viabilidade celular.....</i>	<i>36</i>
3-OBJETIVOS.....	38
3.1-Geral.....	38
3.2-Específicos.....	38
4-MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1-Local do experimento e animais utilizados.....	39
4.2-Reagentes.....	39
4.3-Tratamentos.....	39
<i>4.3.1- Integridade de DNA através de sondas fluorescentes.....</i>	<i>41</i>
<i>4.3.2- Integridade de membrana acrossomal através de sondas fluorescentes.....</i>	<i>41</i>
<i>4.3.3- Teste de viabilidade celular.....</i>	<i>41</i>
<i>4.3.4- Avaliação da integridade de membrana plasmática dos espermatozoides pela coloração eosina- nigrosina.....</i>	<i>42</i>
4.4-Análise estatística.....	42
5-RESULTADOS.....	43
5.1- Resultados da avaliação da cromatina dos espermatozoides (AO).....	43
5.2-Resultados da avaliação da integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides, pela coloração fluorescente FITC-PSA.....	45

5.3- Resultados do teste de viabilidade celular.....	48
5.4- Resultados da avaliação da membrana plasmática por eosina-nigrosina.....	51
6-DISSCUSSÃO.....	53
7-CONCLUSÃO.....	63
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

Lista de Figuras

Figura 1. Gráfico acridine orange.....	43
Figura 2. Gráfico FITC-PSA.....	46
Figura 3. Gráfico do MTT zero hora.....	48
Figura 4. Gráfico do MTT 6H 37° C.....	48
Figura 5. Gráfico do MTT 6H resfriado.....	48
Figura 6. Gráfico do MTT 24 horas.....	48
Figura 7. Gráfico do MTT completo.....	49
Figura 8. Gráfico eosina-nigrosina.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1. Médias $\pm$ erro padrão do número de espermatozóides com cromatina danificada.....	43
Tabela 2. Médias $\pm$ erro padrão do número de espermatozóides com membrana acrossomal íntegra.....	45
Tabela 3. Médias $\pm$ erro padrão dos valores de absorbância (570 e 690nm) do teste MTT.....	49
Tabela 4. Médias $\pm$ erro padrão da percentagem de espermatozóides vivos.....	51

Resumo

A avaliação da eficácia reprodutiva do garanhão e do sêmen resfriado e/ou congelado é de fundamental importância na prática reprodutiva dos eqüinos. Predizer a fertilidade de um garanhão constitui uma decisão subjetiva. O presente estudo foi realizado com o objetivo de testar diferentes técnicas de coloração, assim como testes que avaliem a viabilidade do sêmen de eqüinos, estudando os efeitos da adição de cisteína e glutathione na integridade da membrana plasmática, do DNA espermático, além de avaliar os efeitos da adição desses antioxidantes na preservação da viabilidade dos espermatozoides submetidos à incubação e refrigeração por curtos períodos.

Foi utilizado sêmen de seis garanhões, que foram fracionados em sete amostras, sendo uma mantida como controle (Grupo Controle) e às outras foi adicionado os antioxidantes cisteína, na proporção de 1,0mM (Grupo C1,0); 1,5mM (Grupo C1,5); 2,5mM (Grupo C 2,5) e glutathione também na proporção de 1,0mM (Grupo G1,0); 1,5mM (Grupo G1,5) e 2,5mM (Grupo G 2,5). Todas as análises foram realizadas a cada seis horas. Os três tratamentos foram: Tratamento I – resfriado a 12 °C, por 12 horas (zero hora; 6h resf.; 12h resf.), em caixas refrigeradas; Tratamento II – incubado em banho-maria a 37 °C, por 12 horas (6h 37° C; 12h 37° C) e Tratamento III – resfriado e posteriormente incubado, conforme os Tratamentos I e II. A avaliação da integridade da membrana plasmática foi feita pela coloração eosina-nigrosina; da membrana acrossomal pelo FITC-PSA e do DNA pela laranja de acridina. A avaliação da viabilidade do sêmen foi realizada pelo ensaio do MTT, de acordo com Mosmann (1983).

Os resultados obtidos mostraram que os antioxidantes foram eficientes ($p < 0,05$) em manter a cromatina do DNA intacta, especialmente a glutathione. Na membrana acrossomal houve proteção dos antioxidantes, nos momentos 18 e 24 horas, sendo que nos demais tratamentos, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos tratados e o grupo controle. O teste do MTT mostrou que os grupos tratados com antioxidantes tiveram valores de absorbância próximos aos do controle, mostrando efeito positivo ($p < 0,05$) apenas quando resfriados por seis horas, no grupo cisteína 2,5. Em relação à membrana plasmática dos espermatozoides, corados por eosina-nigrosina, não houve efeito protetor dos antioxidantes nas amostras avaliadas. Um fator avaliado foi que o resfriamento, por si só, independente da adição dos antioxidantes utilizados, já foi eficaz em proteger os espermatozoides. E a incubação a

37° C causa danos a essas células, e a adição de cisteína e glutathione foi eficiente em, senão proteger, mas manter a integridade dos fatores avaliados, não causando mais danos aos espermatozoides.

Palavras chaves: cisteína, glutathione, MTT, FITC-PSA, laranja de acridina, espermatozoide, ganho

Abstract

The evaluation of the reproductive capacity of stallions and semen cooled and / or frozen is of fundamental importance in practical breeding of horses. Whereas predicting the fertility of a stallion is still a subjective decision, the present study was conducted to evaluate different staining techniques, as well as tests that assess the viability of semen in horses, studying the effects of the addition of cysteine and glutathione in plasma membrane integrity of sperm DNA, and to evaluate the effects of the addition of these antioxidants in preserving the viability of sperm undergoing incubation and refrigerated for short periods.

We used semen from six stallions, which were split into seven samples, one kept as control (Control Group) and other antioxidants cysteine was added at a ratio of 1.0 mM (Group C1, 0), 1.5 mM (Group C1, 5), 2.5 mM (Group C 2.5) and glutathione also at 1.0 mM (Group G1, 0), 1.5 mM (Group G1, 5) and 2.5 mM (Group G 2.5). All tests were performed every six hours. The three treatments were: Treatment I – cooled to 12 °C for 12 hours (zero hour; 6h resf.; 12h resf.) Chilled in boxes; Treatment II – incubated in a water bath at 37 °C for 12 hours (6h 37 ° C, 12h 37 ° C) and Treatment III - cooled and subsequently incubated, according to the treatments I and II. The evaluation of plasma membrane integrity was performed by staining eosine-nigrosin; acrosomal membrane by FITC-PSA and DNA by acridine orange. For each analysis were numbered 200 to 500 cells. The evaluation of the viability of sperm was performed by MTT assay according to Mosmann (1983).

The results showed that antioxidants were effective ($p < 0.05$) in keeping the DNA intact chromatin, especially glutathione. In the acrosome of antioxidants were protective, at times 18 and 24 hours, and in other treatments, no significant difference ($p > 0.05$) between control and treated groups. The MTT test showed that groups treated with antioxidants had absorbance values similar to those of control, showing positive effect ($p < 0.05$) only when cooled by six o'clock in the cysteine group 2.5. In relation to the plasma membrane of spermatozoa stained with eosin-nigrosin, no protective effect of antioxidants in the samples. The values of their averages were close to the control group ($p > 0.05$). One factor was estimated that cooling per se, independent of the addition of antioxidants used, has been effective in protecting the

sperm. And the incubation at 37 ° C causes these cells, and the addition of cysteine

and glutathione were efficient, if not protect, but to maintain the integrity of the factors evaluated, not causing more damage to sperm.

Keywords: cystein, glutathione, MTT, FITC-PSA, acridine orange, spermatozoa, stallion