

EFEITO DA VIA L-ARGININA / ÓXIDO NÍTRICO / MONOFOSFATO
CÍCLICO DE GUANOSINA NA QUALIDADE DA CAPACITAÇÃO

ANA CAROLINA DE MACEDO SOARES LEAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JUNHO – 2012

ANA CAROLINA DE MACEDO SOARES LEAL

**EFEITO DA VIA L-ARGININA / ÓXIDO NÍTRICO / MONOFOSFATO
CÍCLICO DE GUANOSINA NA QUALIDADE DA CAPACITAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal, na Área de Concentração de Reprodução e Melhoramento Genético Animal

ORIENTADORA: PROF.^a MARIA CLARA CALDAS BUSSIÈRE

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JUNHO – 2012**

ANA CAROLINA DE MACEDO SOARES LEAL

**EFEITO DA VIA L-ARGININA / ÓXIDO NÍTRICO / MONOFOSFATO
CÍCLICO DE GUANOSINA NA QUALIDADE DA CAPACITAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal, na Área de Concentração de Reprodução e Melhoramento Genético Animal

Apresentada em 4 de Junho de 2012

Banca Examinadora:

Prof. Rubens Paes de Arruda (Doutor, Biotecnologia da Reprodução) –
USP

Prof.^a Marilvia Dansa de Alencar Petretski (Doutora, Ciência) – UENF

Prof. Renato Augusto DaMatta (Doutor, Ciência) – UENF

Prof. Angelo Burla Dias (Doutor, Medicina Veterinária) – UENF

Prof. José Frederico Straggiotti Silva (Doutor, Medicina Veterinária) –
UENF

Prof.^a Maria Clara Caldas Bussiere (Doutora, Fisiologia da Reprodução) –
UENF (ORIENTADORA)

Dedico esta tese à instituição que é a base de minha vida: **minha família!** Ao meu marido Pedro Gama, meu companheiro de todas as horas, meu ponto de equilíbrio. Seu carinho, paciência, dedicação e sua forma positiva de enfrentar as dificuldades da vida foram incentivos determinantes para eu chegar até aqui. Aos meus pais, Ronaldo e Leonor, sinais inegáveis das mãos de DEUS em minha vida, dedico este trabalho com a mais profunda admiração, respeito e amor. Aos meus irmãos, Isabela e Gabriel, pelo carinho e companhia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus preciosos pais **RONALDO e LEONOR**, grandes incentivadores dos meus estudos e da minha vida;

Ao meu marido **PEDRO GAMA**, pela amizade, confiança, compreensão e incentivo para com este trabalho;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), por me oferecerem este curso;

Ao Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA), que me acolheu, dando-me grandes ensinamentos na pesquisa;

À CAPES por oferecer-me a bolsa de estudos;

À minha orientadora **MARIA CLARA CALDAS BUSSIERE**, pela confiança, orientação, dedicação, grande esforço, auxílio e incentivo ao longo de todos esses anos para desenvolver este trabalho;

Às queridas técnicas e amigas, **CARLA PAES DE CARVALHO e BRUNA DIAS**, por todo auxílio no laboratório, incentivos e dedicação;

À minha querida amiga de profissão e para toda a vida, **KELEN VIANA**, orgulho de profissional e dedicação, pelos ensinamentos na FIV, ajuda e carinho nessa trajetória;

À professora **CÉLIA RAQUEL**, pelo auxílio com a estatística e ombro amigo nas horas de angústias;

Aos amigos de trabalho **ÂNGELO DIAS, MAURÍCIO MOGOLLON, DIEGO DUBEIBE, VALTER MACIEL, FAUSTO PAES, JOÃO GOMES, ALINE CURCIO, JANAÍNA LEITE, MARIANE AZEVEDO, CONCEIÇÃO e GEOVANA**, pela convivência, ajuda e grande carinho;

Ào querido professor **OTÁVIO MITIO OHASHI** e toda a sua equipe, em especial, aos atenciosos **MARCELA CORDEIRO, THIAGO VELASCO e NATHALIA NOGUEIRA**, por me receberem tão carinhosamente no laboratório, permitindo a finalização deste trabalho

BIOGRAFIA

ANA CAROLINA DE MACEDO SOARES LEAL GAMA, filha de Ronaldo Costa Leal e Maria Leonor de Macedo Soares Leal, irmã de Leonardo de Macedo Soares Leal, Isabela de Macedo Soares Leal e Gabriel de Macedo Soares Leal, nasceu em 15 de Março de 1981, na cidade de Niterói – RJ.

Em 10 de março de 2001, iniciou o curso de Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes – RJ.

Em Junho de 2001, estagiou no Laboratório de Melhoramento Genético Animal (LMGA) com criopreservação de sêmen caprino, sob orientação do mestre Fausto Paes de Carvalho.

Em 2002, no mesmo laboratório, iniciou o estágio com o estudo do papel do óxido nítrico na capacitação espermática bovina, orientada pela professora Maria Clara Caldas Bussiere.

Em 2003, por meio de um processo seletivo na UENF, foi-lhe concedida uma bolsa de iniciação científica para desenvolver o trabalho sobre óxido nítrico na capacitação de espermatozoides bovinos *in natura*, sob a orientação da Prof.^a Maria Clara Caldas Bussiere.

Ainda em 2003, estagiou no projeto TAMAR, base do Farol de São Tomé, Campos dos Goytacazes – RJ, sendo orientada pelo Biólogo Wanderson Lima.

Em 2004, concomitantemente ao trabalho desenvolvido no LRMGA, estagiou no Centro de Diagnóstico e Tratamento Veterinário (CDTV), sob orientação dos Mestres em Medicina Veterinária César Ferreira e Ewerton Cardoso.

Em abril de 2006, concluiu o curso de nível superior em Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Em janeiro de 2006, por meio de um concurso, foi selecionada para o curso de Pós-graduação em produção animal, nível de mestrado na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, com bolsa da CAPES, o qual foi concluído em março de 2008.

Em janeiro de 2008, por meio de um concurso, foi selecionada para o curso de Pós-graduação em Ciência Animal, nível de Doutorado, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, com bolsa da CAPES, o qual se iniciou em março de 2008.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do óxido nítrico (NO), a via L-arg/NO/GMPc e mecanismos de ação na qualidade da capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos criopreservados, por meio da adição da L-arginina (L-arg, precursora da síntese de NO), 1*H*-(1,2,4) oxadiazolo-(4,3-*a*) quinoxalin-1-ona (ODQ, inibidor da guanilato ciclase solúvel, GCs) e 8-Br-GMPc (Br-GMPc, análogo do GMPc) e seu reflexo na produção *in vitro* de embriões. No experimento 01 foram avaliados a motilidade e o vigor pela microscopia de luz indireta, a integridade de membrana plasmática (MP), acrossomal (MA) e o potencial mitocondrial (PM) pela associação de 4 sondas fluorescentes (IP; hoescht; FITC-PSA e JC1) e a concentração de nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) pelo método de Griess após 4 h de capacitação. A adição de 1 mM de L-arg aumentou a síntese de NO (42,7%), a motilidade (10,2%), o vigor (15,4%) e a integridade de MP, MA e PM (43,4%) semelhante ao aumento obtido após a adição de 5 mM de Br-GMPc para todos os parâmetros avaliados ($P < 0,05$). A adição de 0,1 mM de ODQ diminuiu a síntese de NO (13,6%), a motilidade (55%), o vigor (34,6%) e a integridade de MP, MA e PM (84,4% - $P < 0,05$). No experimento 02, foi avaliado a peroxidação lipídica após a capacitação (4 h). A adição de 1 mM de L-arg e 5 mM de Br-GMPc diminuiu (27,7 e 34,3% respectivamente) a produção de hidroperóxido lipídico no espermatozoide ($P < 0,05$) sugerindo uma ação protetora na membrana. No experimento 03 foram avaliados a capacitação e a reação acrossômica (RA) pelo teste de clortetraciclina (CTC). A adição de 1 e 10 mM de L-arg e 5 mM de Br-GMPc aumentou a capacitação (39,9; 10,1 e 26% respectivamente) e diminuiu a RA (37,6; 30,5 e 41,6% respectivamente - $P < 0,05$). A adição de ODQ (0,1 mM) diminuiu a capacitação (25,5%) e aumentou a RA (17,2% - $P < 0,05$). No experimento 04 a qualidade espermática foi avaliada pela taxa de produção de blastocistos *in vitro* utilizando espermatozoides pré-capacitados por 30 min com os mesmos tratamentos do experimento 02. A adição de 1 mM de L-arg melhorou todos os parâmetros avaliados no espermatozoide mas não aumentou a produção de blastocistos ($P > 0,05$). Contudo, o aumento foi obtido após a adição de 5 mM de Br-GMPc (15,7%). A adição de 0,1 mM de ODQ diminuiu (14,9%) a produção de blastocistos ($P < 0,05$). Esses resultados indicam que: 1) o NO está envolvido no controle da motilidade, vigor, integridade de MP, MA e PM, peroxidação lipídica, capacitação, RA e produção de blastocistos via NOS/NO/GMPc; 2) o NO está envolvido no controle da capacitação via GMPc; 3) o estado de atividade do GMPc regula a síntese de NO por retro-alimentação negativa; 4) a via L-arg/NO/GMPc está envolvida no controle da peroxidação lipídica modulando a produção de hidroperóxido lipídico no espermatozoide e peróxido de hidrogênio no meio de cultivo; 5) concentração ideal de NO durante a capacitação é necessária para a produção de embriões bovinos *in vitro* mas o NO não é o fator determinante e 6) a qualidade espermática sob a influência da via L-arg/NO/GMPc tem reflexo na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Palavras chave: óxido nítrico, espermatozoides, bovino, L-arginina, GMPc, ODQ

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effects of nitric oxide (NO) in route L-arg/NO/cGMP and mechanisms of action the quality of *in vitro* capacitation of cryopreserved bovine sperm by the addition of L-arginine (L-arg, precursor synthesis NO), 1*H*-(1,2,4) oxadiazolo-(4,3-*a*) quinoxalin-1-one (ODQ, inhibitor of activity of soluble guanylyl cyclase, sGC) and 8-bromo-cGMP (Br-cGMP, cGMP analog) and its impacts on *in vitro* production of blastocysts. In experiment 01, the motility and vigor were appraised using indirect light, the integrity of the plasma membrane (PM), acrosome (MA) and mitochondrial potential (MP) were assessed by the association of four fluorescent probes (IP, hoescht, FITC-PSA, JC1) and the concentration of nitrate/nitrite (NO₃⁻/NO₂⁻) by the Griess after 4 h of capacitation. The addition of 1 mM L-arg increased NO synthesis (42.7%), the motility (10.2%), the vigor (15.4%) and the integrity of MP, MA and PM (43.4%) similar to the growth obtained after the addition of 5 mM Br-cGMP for all parameters measured (P<0.05). The addition of 1 mM ODQ decreased NO synthesis (13.6%), the motility (55%), the vigor (34.6%) and the integrity of MP, MA and PM (84.4% - P<0.05). In experiment 02, was evaluated lipid peroxidation after capacitation (4 h) with the concentration of L-arg which showed stimulatory effect (1 mM) and effect inhibition (10 mM) in experiment 01, ODQ (0.1 mM) and Br-GMPc (5 and 10 mM). The addition of 1 mM L-arg and 5 mM Br-cGMP decreased (27.7 and 34.3%, respectively) the production of lipid hydroperoxide in sperm (P<0.05) suggesting protective effect on sperm membrane. In experiment 03 were evaluated capacitation and acrosome reaction (RA) by the chlortetracycline test (CTC). The addition of 1 and 10 mM L-arg and 5 mM Br-cGMP increased capacitation (39.9, 10.1 and 26% respectively) and decreased the RA (37.6, 30.5 and 41.6% respectively - P<0.05). The addition of ODQ (0.1 mM) decreased capacitation (25.5%) and increased RA (17.2% - P<0.05). In experiment 04, sperm quality was evaluated by the blastocyst rate *in vitro* after prior capacitation of sperm for 30 min, using the same treatment experiment 02. The addition of 1 mM L-arg improved the parameter setting in all evaluated in sperm, did not increase the blastocyst rate (P>0.05). However, the increase was obtained after addition of 5 mM Br-cGMP (15.7%). The addition of 0.1 mM ODQ decreased (14.9%) blastocysts rate (P<0.05). These results indicate that: 1) NO is involved in the controlling motility, vigor, integrity of MP, MA e PM, lipid peroxidation, capacitation, RA and blastocysts rate pathway NOS/NO/GMPc; 2) NO is involved in the controlling capacitation pathway cGMP; 3) the state activity of cGMP regulates synthesis by negative feedback; 4) the pathway L-arg/NO/GMPc is involved in controlling lipid peroxidation by modulating the production of lipid hydroperoxide in the sperm and hydrogen peroxide in the culture medium; 5) an optimal concentration of NO during the capacitation is needed for the production of bovine embryos, but, NO is not the single determining factor; 6) sperm quality under the influence of the pathway L-arg/NO/GMPc is reflected in the *in vitro* production of bovine embryos.

Keywords: nitric oxide, spermatozoa, bovine, L-arginina, GMPc, ODQ

LISTA DE FIGURAS

Figura 01-	Mapa seqüencial das três isoformas da NO sintase de humanos, ilustrando o domínio redutase, oxigenase e seus cofatores.....	10
Figura 02-	Esquema ilustrativo do caminho da transdução do sistema NO-GMPc em células de mamíferos.....	11
Figura 03-	Domínios da membrana plasmática de rato e coelho	18
Figura 04-	Fosfolipídios fluorescentes da membrana do espermatozoide suíno, que mostra espermatozoide do ejaculado fresco e (b) espermatozoide após a capacitação.....	21
Figura 05-	Etapas da reação em cadeia da lipoperoxidação.....	27
Figura 06-	Interconversão da glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSH) pela ação das enzimas GSH-Px, glutathiona oxidase (GO) e glutathiona redutase (GR ou GSH-Rd)	30
Figura 07-	Sistema enzimático de defesa antioxidante representado pela ação conjunta da catalase e SOD.....	33
Figura 08-	Representação do estresse oxidativo resultante do desbalanceamento entre o nível de antioxidante (AOX) e espécies de oxigênio reativo (ROS), seja pelo excesso de ROS ou depleção de AOX.....	34
Figura 09-	Esquema de diferentes reações de derivação para glutathiona empregando reagentes seletivos para determinação espectrofluorimétrica de tiois: (I) OPA (II) m-BBr.....	40
Figura 10-	Reação utilizada na determinação potenciométrica da glutathiona reduzida envolvendo 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e a enzima glutathiona transferase.....	41
Figura 11-	Reação entre a glutathiona reduzida e DTNB (reagente de Ellman) para a determinação de hidroperóxidos empregando a enzima glutathiona peroxidase.....	42
Figura 12-	Propriedades fluorescentes do C11-BODIPY ^{581/591} e seu produto da oxidação.....	43

Figura 13- Espermatozoides de suínos corados com C11-BODIPY ^{581/591} avaliados com microscópio confocal de fluorescência	44
Figura 14- Cadeia transportadora de elétrons no espaço intermembrana da mitocôndria com conseqüente síntese de ATP.....	46
Figura 15- Espermatozoides corados com JC1, iodeto de propídio e hoechst...	54

LISTA DE ABREVIATURA

ADP – difosfato de adenosina
AMPc – monofosfato de adenosina cíclica
AOX – antioxidante
ATP – trifosfato de adenosina
ATPmt - trifosfato de adenosina mitocondrial
BSA – soro albumina bovina
Br-GMPc - 8-bromo-GMPc, análogo do GMPc
CaM – calmodulina
CAT- catalase
cGK- proteína quinase
CNG – canais de íons
CTC – clortetraciclina
DNAmT – ácido desoxirribonucleico mitocondrial
DTNB – o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
FAD – dinucleotídeo adenina flavina
FIV – fertilização *in vitro*
FMN – mononucleotídeo flavina
FSH – hormônio folículo estimulante
GCs – guanilato ciclase solúvel
GKs – proteína kinase
GMPc – guanosina monofosfato cíclica
GSH – glutationa
GSH-Px – glutationa peroxidase
GSH-Rd – glutationa redutase
GSNO – S-Nitrosoglutamine, doador de NO
GSSG – glutationa oxidada
GST – enzima glutationa transferase
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
IBMX – 1-metil-3-(2-metilpropil)-7H-purine-2,6-dione, inibidor da fosfodiesterase
iNOS – óxido nítrico sintase induzível
JC1 – iodeto de 5,5',6,6'-tetracoloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina

kDa – kilodalton
L-arg – L-arginina
L-NAME – N ω -nitro-L-arginina metil éster
MA – membrana acrossomal
MDA – malonaldeído
mtNOS – óxido nítrico sintase mitocondrial
MP – membrana plasmática
NADPH – dinucleotídeo adenina nicotinamida fosfato
nNOS – óxido nítrico sintase neuronal
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
ODQ – 1*H*-(1,2,4) oxadiazolo-(4,3-*a*)quinoxalin-1-ona
PDE – fosfodiesterase
PIV – produção *in vitro* de embriões
PKA – proteína quinase A
RA – reação acrossômica
RNAr – ácido ribonucléico
ROS – espécie de oxigênio reativo
RNA_t – ácido rinonucléico transportador
SNP – nitroprussiato de sódio, doador de óxido nítrico
SOD- superóxido dismutase
Talp – meio de Tyroides modificado
Talp-fec – meio tyroides de fecundação
TBA – ácido tiobarbitúrico
TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNB - ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
Trolox C - 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico
Vit C – vitamina C
Vit E – vitamina E
ZP – zona pelúcida

SUMÁRIO

BIOGRAFIA	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Capacitação espermática	4
3.1.1. Capacitação espermática <i>in vitro</i>	5
3.1.2. Duração da capacitação	6
3.2. Óxido nítrico	7
3.3. Isoformas da NOS	9
3.4. Sistema NO-cGMP	11
3.5. Precursor da síntese de NO	12
3.6. 8-bromo-GMPc (Br-GMPc)	14
3.7. 1H-(1,2,4) oxadiazolo-(4,3-a)quinoxalin-1-ona (ODQ)	14
3.8. Motilidade progressiva	15
3.9. Hiperativação da motilidade espermática	16
3.10. Vigor	17
3.11. Membrana plasmática (MP)	17
3.11.1. Fosfolípido dos espermatozoides	19
3.11.2. Glicolípídeos dos espermatozoides	21
3.11.3. Esteroides dos espermatozoides	21
3.11.4. Glicocálice x Capacitação	23
3.11.5. Fisiologia da membrana espermática e importância para fertilização	23
3.11.6. Integridade da membrana espermática	24
3.11.7. Espécie de oxigênio reativa (ROS)	25
3.11.8. Peroxidação lipídica	27
3.11.9. Antioxidantes	29
3.11.9.1. Antioxidante Enzimático	29
3.11.9.1.1. Glutathiona	29
3.11.9.1.2. Glutathiona reduzida (GSH)	30
3.11.9.1.3. Glutathiona-redutase (GSH-Rd)	31

3.11.9.1.4. Glutationa-peroxidase (GSH-Px).....	31
3.11.9.1.5. Superóxido dismutase (SOD).....	32
3.11.9.1.5. Catalase (CAT).....	32
3.11.10. Estresse oxidativo.....	33
3.11.11. Danos causados ao espermatozoide pelos ROS	35
3.11.12. Efeito da peroxidação lipídica na célula espermática	36
3.11.13. Avaliação do estresse oxidativo e peroxidação lipídica (avaliação das ROS, atividades enzimáticas e tripeptídeos).....	38
3.11.14. Localização da peroxidação na célula espermática	42
3.12. Mitocôndria.....	44
3.12.1. Síntese de ATP.....	45
3.12.2. Efeito do óxido nítrico (NO) na respiração mitocondrial	47
3.12.3. Apoptose X mitocôndria.....	49
3.12.4. Ácido desoxirribonucléico mitocondrial (DNAmt).....	50
3.12.5. Avaliação da atividade mitocondrial.....	51
3.12.5.1. <i>Rodamina 123 (R123)</i>	51
3.12.5.2. <i>Mitotracker</i>	52
3.12.5.3. <i>JC1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina)</i>	53
3.13. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	54
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
5. ARTIGO SUBMETIDO PARA O ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (ABMVZ)	90
6. ARTIGO A SER SUBMETIDO À ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE	104

1- INTRODUÇÃO

A fertilização *in vitro* (FIV) é um dos grandes avanços alçado pela biotecnologia reprodutiva. No entanto, nos dias atuais, ela ainda alcança limitações demonstradas em etapas subsequentes do desenvolvimento embrionário da produção *in vitro* de embriões – PIV. A utilização da L-arginina (L-arg, precursora da síntese de óxido nítrico - NO) e do Br-GMPc (análogo sintético da GMPc – principal via utilizada pelo NO na capacitação), no meio de capacitação, tem o objetivo de melhorar os parâmetros espermáticos para se alçar maior eficiência na FIV e conseqüentemente na PIV, por aumentar a disponibilidade de NO no meio capacitante.

O NO é uma espécie de nitrogênio reativa, podendo atuar na sinalização inter e intracelular, agindo como antioxidante ou radical livre (DIXIT e PARVIZI, 2001). Ele é um gás incolor à temperatura e pressão ambiente, biologicamente ativo em quase todas as células do organismo, e se difunde livremente através das membranas, uma vez que tem um baixo peso molecular (LOWENSTEIN *et al.*, 1994).

Durante a conversão da L-arg em L-citrulina, o NO é produzido por reações oxidativas catalisadas pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), utilizando oxigênio, dinucleotídeo adenina nicotinamida fosfato (NADPH) (MONCADA e HIGGS, 1993), dinucleotídeo adenina flavina (FAD), mononucleotídeo flavina (FMN) (DONNELLY *et al.*, 1997) e cálcio/calmodulina (CaM) como co-fatores. Existem três isoformas da NOS: duas constitutivas, dependentes de cálcio (NOS neuronal (nNOS); NOS endotelial (eNOS) e uma induzível (iNOS), cálcio independente (FRANCAVILLA *et al.*, 2000). Contudo, alguns trabalhos já relataram a expressão constitutiva para a iNOS em alguns tipos celulares (GATH *et al.*, 1996).

A localização e função de algumas isoformas da NOS têm sido descritas em espermatozoides bovinos (MEISER e SCHULZ, 2003; O'FLAHERTY *et al.*, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2011), estando presentes no acrossoma e na cauda (O'FLAHERTY *et al.*, 2004) atuando na motilidade, capacitação (PAES DE CARVALHO *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2004; FERREIRA-BERBARI *et al.*, 2010; LEAL *et al.*, 2009) e reação acrossômica (RA) (RODRIGUES *et al.*, 2004).

A capacitação espermática e a RA são eventos imprescindíveis para o sucesso da fertilização do oócito, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, dependendo da ação do NO para que ocorram em bovinos (RODRIGUEZ *et al.*, 2004; O'FLAHERTY *et al.*, 2004; FERREIRA-BERBARI *et al.*, 2007, 2010; LEAL *et al.*, 2009), suínos (FUNAHASHI.,

2002) e bubalinos (ROY e ATREJA, 2008). O aumento de NO no meio de capacitação induz à RA em humanos (HERRERO *et al.*, 2000); roedores (GUZMAN-GRENFELL *et al.*, 1999) e bovinos (O'FLAHERTY *et al.*, 2004).

A L-arg tem sido utilizada nos estudos sobre o papel do NO na capacitação espermática e RA. O'Flaherty *et al.*, (2004) adicionaram L-arg (10, 20, 30, 40, 50 mM) no meio de cultivo e observaram que a adição de 10 mM melhorou a motilidade, a capacitação e a reação acrossômica de espermatozoides bovinos após 45 min. Concentrações mais elevadas inibiram a motilidade, no entanto, a viabilidade e RA não apresentaram diferença significativa quando comparados com o controle, mas mantiveram o efeito estimulatório na capacitação espermática.

Roy e Atreja (2008) verificaram que a adição de L-arg (15 e 20 mM) diminuiu a motilidade e a integridade da membrana, mas concentrações menores (5 e 10 mM) aumentaram a capacitação. Leal *et al.* (2009) observaram que a após a adição de 10 mM de L-arg no meio de cultivo *in vitro* em bovinos, houve um aumento da motilidade a partir de 4 h, do vigor e da integridade de membrana a partir de 15 min de capacitação. Também foi observado um aumento da concentração de nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) no meio de capacitação, da atividade mitocondrial e da porcentagem de oócitos penetrados após a adição de 10 mM de L-arg no meio de capacitação *in vitro* de espermatozoides de bovino.

O 1H-(1,2,4) oxadiazolo-(4,3-a)quinoxalin-1-ona (ODQ) é um inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs) enzima responsável pela síntese do GMPc solúvel (GARTHWAITE *et al.*, 1995), principal via utilizada pelo NO na capacitação espermática. Ele tem sido utilizado juntamente com o 8-bromo-GMPc (Br-GMPc, análogo do GMPc) na busca de melhores entendimentos da via e mecanismos de ação do NO. A adição de 50 $\mu\text{mol/L}$ de ODQ em espermatozoides de humanos, por 20 min, diminuiu a concentração intracelular de GMPc enquanto que a adição de 1 mmol/L de Br-GMPc aumentou, comparado com o controle (MIRAGLIA *et al.*, 2007). Santos-Sacchi e Gordon (1980) demonstraram que a adição de 10 mM de GMPc no meio de capacitação por 1 h, aumentou a RA em cobaias.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de pesquisar os efeitos do NO na capacitação *in vitro* de espermatozoides de bovino criopreservados por meio da utilização da L-arg; Br-GMPc e ODQ, e seu efeito na produção *in vitro* de embriões. Com isso, espera-se avaliar a influência da qualidade espermática na produção e qualidade *in vitro* de embriões.

2- OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da L-arg, ODQ e Br-GMPc na capacitação espermática e seu reflexo na produção e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar os mecanismos de ação da L-arg, ODQ e Br-GMPc durante a capacitação espermática;

2.2.2. Avaliar a via de ação do NO na capacitação espermática;

2.2.3. Avaliar a qualidade do espermatozoide após adição da L-arg, ODQ e do Br-GMPc no meio de capacitação e seu reflexo na produção de blastocistos.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Capacitação espermática

A capacitação espermática em bovinos é determinada pela capacidade do espermatozoide fertilizar o oócito, seja *in vivo* ou *in vitro*. Os espermatozoides de mamíferos não são capazes de fertilizar o oócito imediatamente após serem ejaculados; necessitam passar por um período de capacitação que normalmente ocorre no trato reprodutor da fêmea (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951). No entanto, tem-se criado meios específicos que permitem a capacitação *in vitro* destes gametas.

A capacitação espermática envolve vários eventos bioquímicos e está correlacionada com mudanças na concentração intracelular de íons, entrada de cálcio (HANDROW *et al.*, 1989; BALDI *et al.*, 1991), aumento do pH citosólico (VRENDENBURGH-WILBERG e PARRISH, 1995; FRASER, 1995), diminuição de proteínas espermáticas pela calmodulina (LECLERC *et al.*, 1992), aumento da concentração espermática do AMPc (PARRISH *et al.*, 1994; PARINAUD e MILHET, 1996), geração de baixa concentração do anion superóxido (de LAMIRANDE *et al.*, 1998; O'FLAHERTY *et al.*, 2004), alteração da motilidade espermática – hiperativação (HARRISON, 1996) e fosforilação de proteínas específicas de espermatozoides de rato (VISCONTI *et al.*, 1995), humano (CLELIA e FENICHEL, 1997), bovino (GALANTINO-HOMER *et al.*, 1997) e de búfalos (JAGAN MOHANARAO e ATREJA, 2011).

A fosforilação de proteínas espermáticas implica na capacitação, manutenção e modificação da motilidade e da RA (KOPF e GERTON, 1991). O aumento do número de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina tem sido considerado um consistente marcador bioquímico para a capacitação (JAGAN MOHANARAO e ATREJA, 2011).

Espermatozoides humanos e bovinos incubados em condições capacitantes começam imediatamente a produzir o anion superóxido (O_2^-) (O'FLAHERTY *et al.*, 2006., RODRIGUEZ *et al.*, 2011, respectivamente). Entretanto, a adição da superóxido dismutase (SOD) após 30 min do início da incubação não impede a capacitação, sugerindo que a cascata de eventos pela ROS, que leva à capacitação, inicia-se rapidamente (de LAMIRANDE *et al.*, 1997). A geração de baixa e

controlada concentração de O_2^- , H_2O_2 e NO pelo espermatozoide bovino e humano (de LAMIRANDE *et al.*, 1997) está envolvida com a aquisição da capacidade fertilizante.

Rodriguez *et al.* (2011) demonstraram que a capacitação induzida pela heparina aumenta o consumo de O_2 após 45 min de incubação, estando associada com aumento da capacitação espermática avaliada pelo teste de clortetraciclina fluorescente (CTC). Desse consumo, 21% são utilizados para produzir O_2^- , 19% são utilizados para produzir NO e os 60% restantes podem ser consumidos pela respiração mitocondrial para produzir ATP necessário para suportar o requerimento energético da célula.

In vivo, alguns fatores do sistema reprodutivo da fêmea são descritos como reguladores da capacitação, sendo eles; fluido do oviduto de bovinos (HUNTER e HALL, 1974), progesterona (FORESTA *et al.*, 1992; das GUPTA *et al.*, 1994; BARBINI *et al.*, 1995; de LAMIRANDE *et al.*, 1998), heparina e lipoproteína de alta densidade de bovinos (PARRISH *et al.*, 1988).

3.1.1. Capacitação espermática *in vitro*

A capacitação espermática em bovinos pode ser iniciada pela incubação dos espermatozoides em um meio livre do fluido seminal, com heparina (CHAMBERLAND *et al.*, 2001), simulando o local do trato reprodutor da fêmea, definido como meio capacitante, que retém o espermatozoide em um estado competente. A remoção do fluido seminal é essencial, pois ele contém fatores “decapitantes”, como o colesterol, que inibem a capacitação (YANAGIMACHI, 1994), apesar de já ter sido relatado o papel benéfico de algumas proteínas do plasma para as funções das células espermáticas (BERGERON e MANJUNATH, 2006).

A heparina, um glicosaminoglicano presente no trato reprodutor de fêmeas mamíferas, tem sido considerada a principal substância que promove a capacitação *in vitro* sem induzir a reação acrossômica em espermatozoides bovinos (PARRISH *et al.*, 1988; CHAMBERLAND *et al.*, 2001). No entanto, a capacitação com concentrações ótimas de bicarbonato, cafeína ou adenosina chegou ao mesmo nível de capacitação alcançado pela heparina, avaliado pelo teste do CTC (BREININGER *et al.*, 2010). No meio de capacitação contendo heparina, a motilidade progressiva

(CHAMBERLAND *et al.*, 2001) e a capacitação espermática (RODRIGUEZ *et al.*, 2004; O'FLAHERTY *et al.*, 2004) foram maiores que no controle (sem heparina). Segundo Paes de Carvalho *et al.* (2002), apenas 30% dos espermatozoides bovinos capacitaram na ausência de heparina, após 4 h de incubação, sendo esta avaliada pelo teste de penetração em oócitos homólogos.

Um estudo mais detalhado feito por Roy e Atreja (2008) demonstrou um aumento da capacitação espermática em bubalinos ao adicionar 5 e 10 mM de L-arg, comparado com controle. Em contrapartida, ao adicionar 0,5 mM de L-NAME, inibidor da síntese de NO por competir pelo mesmo sítio de ligação da L-arg, houve uma inibição da capacitação. No entanto, ao adicionar 10 mM de L-arg a 0,5 mM de L-NAME, não foi observada reversão do efeito inibitório do L-NAME. Os autores concluíram que a L-arg é um potente indutor da capacitação de espermatozoides de bubalinos, estando associado ao aumento da fosforilação de resíduos de tirosinas em proteínas, e esse efeito foi mediado pela produção de NO pela NOS (JAGAN MOHANARAO e ATREJA, 2011).

3.1.2. Duração da capacitação

A capacitação é um processo dependente do tempo e da temperatura, que leva o espermatozoide a se ligar na zona pelúcida que circunda o oócito e induz a reação acrossômica (YANAGIMACHI *et al.*, 1994; de LAMIRANDE *et al.*, 1997).

O tempo necessário para completar o processo de capacitação varia entre as diferentes espécies animais, sendo requeridas 2 h em camundongos (VISCANTI e KOPF, 1998) e 4 h em bovinos (PARRISH *et al.*, 1988; CHAMBERLAND *et al.*, 2001), quando realizada *in vitro*. Em humanos, essa capacitação é mais rápida; ocorre com 1 h de incubação (COHEN-DAYAG *et al.*, 1995; JAISWAL *et al.*, 1998).

Para induzir a capacitação *in vitro* em bovinos, Parrish *et al.* (1988) incubaram espermatozoides com heparina (10 mg/mL) e observaram que estes requerem um período de 4 h de incubação a 39 °C para se tornarem capacitados. Isso se deve ao fato de que, após os espermatozoides terem sido incubados com oócitos em meio tiroides de fecundação (TALP-fec), na presença de heparina, ter sido observado maior taxa de oócitos penetrados após 4 h de incubação em relação aos espermatozoides incubados por 25 min, 1 h, 2 h e 3 h.

3.2. Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre (possui um elétron desemparelhado), sintetizado *in vivo* durante a conversão da L-arg em L-citrulina por reações oxidativas catalisadas pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), utilizando oxigênio, NADPH (MONCADA e HIGGS, 1993), dinucleotídeo adenina flavina (FAD), mononucleotídeo flavina (FMN) (DONNELLY *et al.*, 1997) e cálcio/calmodulina (CaM) como co-fatores.

Ele é um gás incolor à temperatura e pressão ambiente, que se difunde livremente através de membranas (DIXIT e PARVIZI, 2001), biologicamente ativo em quase todas as células do organismo, tendo baixo peso molecular (NATHAN, 1992). No entanto, possui uma meia vida biológica muito pequena (SANTORO *et al.*, 2001) dificultando sua mensuração direta na célula.

A magnitude e duração da síntese de NO pelas células determina se a sua ação será patológica ou fisiológica. Vários estudos *in vitro* demonstram que baixa concentração de NO estimula a motilidade de espermatozoides de camundongos (HERRERO *et al.*, 1994), hamsters (YEOMAN *et al.*, 1998) e humanos (HELLSTROM *et al.*, 1994; MIRAGLIA *et al.*, 2011), a capacitação espermática de humanos (ZINI *et al.*, 1995; SENGOKU *et al.*, 1998, MIRAGLIA *et al.*, 2011) e a RA de espermatozoide de camundongo (HERRERO *et al.*, 1997) e bovinos (ZAMIR *et al.*, 1995, RODRIGUEZ *et al.*, 2011).

Contudo, concentrações reduzidas de NO no meio capacitante, devido à inibição de sua síntese pela adição de L-NAME (LEAL *et al.*, 2009), aminoguanidina (inibidor da iNOS) e ácido retinóico (inibidor da eNOS), promoveram diminuição na qualidade espermática e capacitação, diminuindo o número de oócitos homólogos penetrados (FERREIRA-BERBARI *et al.*, 2007, 2010). Alta concentração de NO também parece exercer um efeito deletério na motilidade, integridade da membrana e metabolismo de espermatozoides humanos *in vitro* (FRANCAVILLA *et al.*, 2000; ZINI *et al.*, 1996).

Balercia *et al.* (2004) demonstraram que homens férteis com quantidades normais de espermatozoides (normozoespérmicos) exibem concentrações de NO significativamente menor que os homens inférteis com quantidades diminuídas de espermatozoides (oligozoospérmicos).

Leal *et al.* (2009) demonstraram que a adição de 10 mM de L-arg no meio de capacitação espermática aumentou a concentração nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) quando

comparado com o controle e que houve um efeito dose-resposta na concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ após a adição de diferentes concentrações de L-NAME, quando comparados com o controle e seu enantiômero (D-NAME). A adição de 0,6 mM de L-arg ao meio de capacitação contendo 10 mM L-NAME, impediu a ação inibitória do L-NAME na síntese de NO.

Lampiao *et al.* (2006) mensuraram, diretamente, o NO em espermatozoides humanos por meio da citometria de fluxo, usando diaminofluorescente (DAF-2/DA). Demonstraram a relação dose dependente da fluorescência da DAF-2/DA com NO ao adicionar doses crescentes de nitroprusiato de sódio (SNP- doador de NO - 30, 50 e 100 μM), no meio de capacitação, tendo como resposta um aumento crescente da fluorescência, comparado com o controle, devido ao aumento exógeno de NO.

Rodriguez *et al.* (2011) concluíram que a capacitação induzida pela heparina gera mudanças na atividade dos espermatozoides bovinos criopreservados como aumento na produção de NO pela NOS constitutiva, produção de O_2^- pela NADPH oxidase ligada à membrana da célula e consumo de O_2 mitocondrial por altos níveis de ADP para suprir a energia requerida pela célula. Os produtos de ambas as enzimas são liberados no espaço extracelular e podem estar envolvidos no processo de capacitação espermática.

A exposição dos espermatozoides à luz visível, por 5 min, aumenta a concentração de NO nas células (ANKRI *et al.*, 2010) tendo sido previamente associada ao aumento de ROS imediatamente após a iluminação (BANAN *et al.*, 2001). No entanto, a formação de NO induzida pela luz ocorre apenas quando as células espermáticas estão em meio livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , ou seja, em condições previamente estressantes (ANKRI *et al.*, 2010).

Tem sido relatado que o estresse causa anormalidades nos parâmetros de espermiogramas (ESKIOCAK *et al.*, 2006). Aflições e angústias em humanos têm sido sugeridas como causa dessas infertilidades inexplicadas (HARRISON *et al.*, 1986). Estudos indicam que o estresse tem impacto negativo em vários parâmetros associados com a qualidade do sêmen, incluindo a concentração, motilidade e morfologia (POOK *et al.*, 1999; CLARKE *et al.*, 1999).

Muitos estudos ainda são necessários para um maior entendimento do papel do NO nas funções espermáticas de bovinos. Mais pesquisas devem ser realizadas para identificar qual isoforma da NOS está relacionada com cada atividade

desenvolvida pelo espermatozoide, em qual porção ela se encontra e qual é a concentração ideal para uma ótima capacitação e reação acrossômica.

3.3. Isoformas da NOS

Quatro isoformas da NOS têm sido descritas, sendo três constitutivas, dependentes de cálcio : óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e óxido nítrico sintase mitocondrial (mtNOS); a quarta, cálcio independente, é a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), (FORSTERMANN *et al.*, 1995; FRANCAVILLA *et al.*, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; MEISSER e SCHULZ, 2003; ZEMOJTEL *et al.*, 2006). A mtNOS, apesar de já ter sido relatada há mais de uma década, é muito pouco conhecida, existindo divergências sobre se ela seria realmente uma quarta isoforma ou apenas uma variação da eNOS e/ou iNOS presente no ambiente mitocondrial (ZAMBERLAND, 2009).

A NOS tem sido detectada em epidídimos humanos, testículo (ZINI *et al.*, 1996) e útero (TELFER *et al.*, 1995), sugerindo que pode estar envolvida na capacitação e maturação espermática. A presença da NOS também tem sido demonstrada em espermatozoides de humanos (DONNELLY *et al.*, 1997; ROSSELLI *et al.*, 1998; FRANCAVILLA *et al.*, 2000; BALERCIA *et al.*, 2004; ROESSNER *et al.*, 2010), roedores (BREDET *et al.*, 1991, HERRERO *et al.*, 1994 e KLEIN, 2001), suínos (FUNAHASHI, 2002) e bovinos (RODRIGUEZ *et al.*, 2011), mas não foi identificada a isoforma.

A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) foi encontrada na cabeça de espermatozoides humanos (O'BRYAN *et al.*, 1998) e na membrana e citosol de espermatozoides de bovinos (MEISER e SCHULZ, 2003). Meiser e Schulz (2003) ainda observaram a presença da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) no acrossoma e flagelo de espermatozoides de bovinos. Herrero *et al.* (1996), apesar de não identificarem a isoforma, detectaram a NOS no acrossoma e na cauda de espermatozoides humanos e de camundongos por imunofluorescência.

Análise de imunofluorescência indireta demonstrou que espermatozoides humanos expressam a NOS constitutiva no segmento pós-acrossomal e equatorial (LEWS *et al.*, 1996) enquanto que a NOS ativa está localizada predominantemente no citoplasma, distribuído na cabeça e peça intermediária (ROSSNER *et al.*, 2010).

A presença e a atividade da NOS em espermatozoides humanos é necessária para que eles alcancem o estágio de maturidade, realçando seu papel fisiológico (ROSSNER *et al.*, 2010), pois baixos níveis na produção de NO contribuem para reduzir a capacidade do espermatozoide imaturo atingir a capacitação (HARRISON e GADELLA, 2005). Além disso, elevados níveis de células espermáticas em apoptose e com fragmentação de DNA foram associados com baixos níveis de atividade da NOS no espermatozoide humano (ROSSNER *et al.*, 2010).

As três isoformas mais conhecidas são constituídas de um domínio redutase e de um domínio oxigenase (figura 01). A porção amino terminal, que contém o heme como grupo prostético com o NH₂, pertence ao domínio oxigenase enquanto a porção carboxiterminal (COOH), que contém CaM, FMN, FAD, NADPH, pertence ao domínio redutase (IGNARRO, 2000).

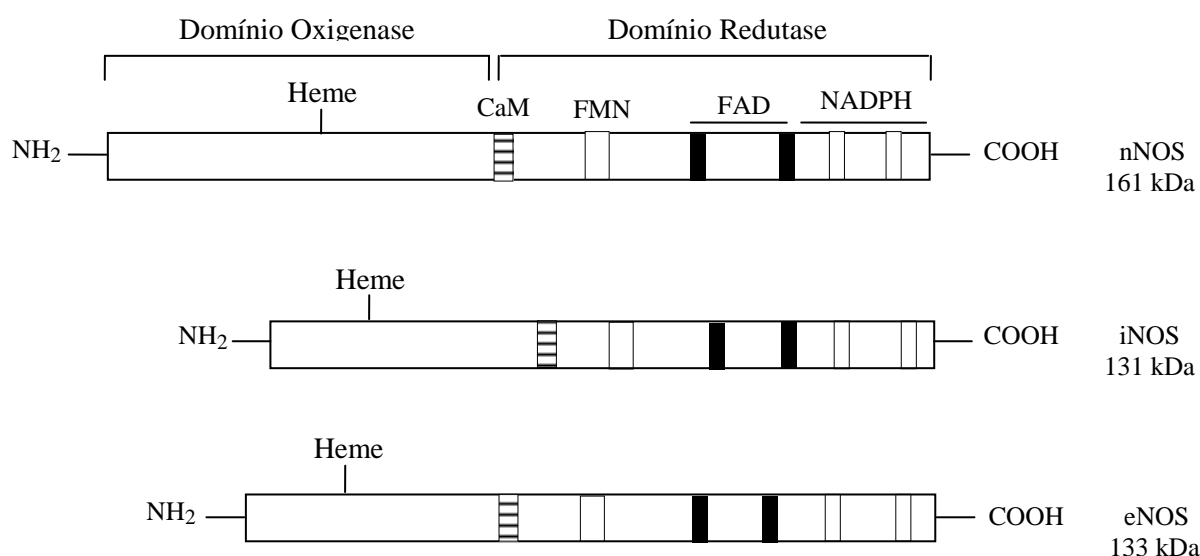


Figura 01- Mapa sequencial das três isoformas mais conhecidas do NO sintase de humanos, ilustrando o domínio redutase, oxigenase e seus cofatores (IGNARRO, 2000).

Pela presença da região CaM pode-se esperar que as três isoformas sejam dependentes de cálcio. No entanto, a quantidade de cálcio requerida pela isoforma induzível é tão insignificante que se considera cálcio independente. Elas se diferenciam pela distribuição de seus domínios e pelo peso molecular (figura 01). A nNOS pesa 161 kDa, a eNOS pesa 133 kDa e a iNOS é a mais leve, pesando 131 kDa (IGNARRO, 2000).

3.4. Sistema NO-GMPc

No sistema NO-GMPc de mamíferos (figura 02), o NO oriundo da conversão da L-arg em L-citrulina vai ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), responsável pela conversão do GTP em GMPc. Esta GMPc pode ser degradada em 5'-GMP ou pode ativar canais de íons (CNG), proteína quinase dependentes de GMPc (cGK) e fosfodiesterases (PDE, a isoforma PDE II é ativada e a PDE III é inibida) (IGNARRO, 2000).

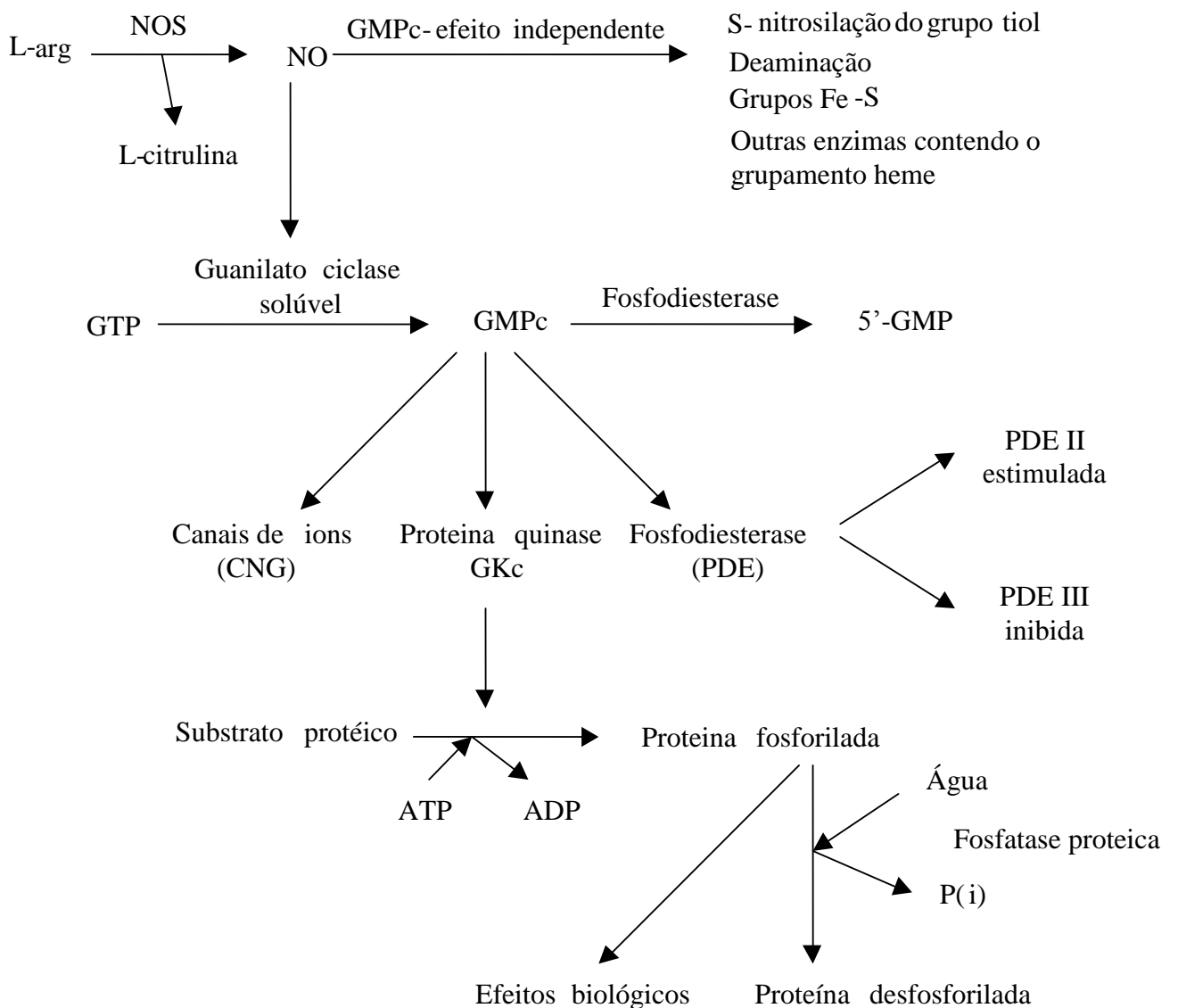


Figura 02- Esquema ilustrativo da via de transdução de sinais do sistema NO-GMPc em células de mamíferos (IGNARRO, 2000).

As GKc, quando ativadas, são responsáveis pela conversão do substrato protéico em proteína fosforilada com a utilização de ATP. Esta proteína fosforilada, por sua vez, será responsável por efeitos biológicos e fosforilações protéicas, com a utilização de uma molécula de água ativada por uma enzima fosfatase protéica (IGNARRO, 2000).

Os efeitos biológicos podem ser inativados por desfosforilações causadas pela proteína fosfatase. Embora muitas das ações biológicas sejam mediadas pela via GMPc, via transdução do sinal, alguns efeitos do NO são GMPc-independente (outras enzimas contendo o grupo heme, S-nitrosilação do grupo tiol, formação do grupo Fe-S, desaminação) (IGNARRO, 2000).

Miraglia *et al.* (2007) descreveram que a sinalização do NO via GMPc está envolvida na quimiotaxia espermática em humanos e esta sinalização envolve a ativação de GKc e conseqüentemente o aumento dos níveis de GMPc. O efeito do NO, aumentado a partir do seu doador, S-Nitrosogluthamine (GSNO), foi mediado via GMPc pois o ODQ (1*H*-(1,2,4) oxadiazolo-(4,3-*a*)quinoxalin-1-ona), um inibidor da guanilato ciclase solúvel, reverteu a ação quimiotática do GSNO. No entanto, esse efeito não está relacionado com a motilidade.

3.5. Precursor da síntese de NO

O aminoácido L-arg é um substrato para a enzima óxido nítrico sintase (NOS) produzir NO (MONCADA *et al.*, 1991). Meiser e Schulz (2003) demonstraram essa afirmação ao adicionar 3 µM de L-arg no meio de capacitação espermática bovina, no qual observaram um aumento considerável (quase 200%) da percentagem da atividade da NOS, quando comparada com o controle (100% de atividade).

Já Roy e Atreja (2008) demonstraram um aumento da produção NO no meio de capacitação espermática de bubalinos, adicionando 5 mM de L-arg, ao dosar a relação nitrato/nitrito no sobrenadante ao longo de 6 h e verificar um aumento em relação ao controle a partir de 0 h. O oposto foi observado ao adicionar 0,5 mM de L-NAME no meio de capacitação, houve uma diminuição da relação nitrato/nitrito formada, quando comparada com o controle. No entanto, ao associar L-NAME com L-arg, pode-se observar uma reversão parcial do efeito inibitório do L-NAME pela L-arg.

O'Flaherty *et al.* (2004) incubaram espermatozoides bovinos criopreservados por 45 min em um meio de capacitação com heparina e nas diferentes concentrações de L-arg (10, 20, 30, 40, e 50 mM). Observaram que a integridade da membrana espermática, após 45 min, se manteve constante, quando comparado com os controles (TALP com e sem heparina). No entanto, a motilidade progressiva decresceu com o aumento da adição da L-arg, quando comparado com os controles. Já em relação à capacitação, foi observado que a adição de concentrações elevadas (10, 20 e 30 mM) de L-arg, durante a incubação de espermatozoides bovinos, aumentou significativamente a percentagem de espermatozoides capacitados, quando comparados com o controle e demais concentrações (1,25; 2,5; 5 mM).

Para melhor acurácia de seus dados, O'Flaherty *et al.* (2004) incubaram espermatozoides bovinos criopreservados em um meio de capacitação contendo L-NAME (1 mM) + L-arg (10 mM) e outro apenas com 10 mM de L-arg. No meio apenas com L-arg observou-se um significativo aumento da capacitação, quando comparado com o controle (TALP com heparina). Já no meio que continha L-NAME + L-arg, foi observada uma discreta inibição da capacitação, quando comparado com o controle (TALP com heparina).

Francavilla *et al.* (2000) também analisaram o efeito da L-arg no deslocamento do L-NAME. No entanto, analisou-o em relação à penetração de espermatozoides humanos em oócitos. Foi observado que o efeito inibidor do L-NAME (0,6 mM) desapareceu, quando se adicionou L-arg na concentração de 6 mM.

O fato de altas concentrações de L-arg (40 e 50 mM) terem inibido a motilidade progressiva, sem alterar a integridade da membrana espermática, sugere que altas concentrações de NO, produzidas pela conversão do aminoácido em NO, diminui a motilidade espermática, chegando a tornar o espermatozoide imóvel (O'FLAHERTY *et al.*, 2004).

Roy e Atreja (2008) ao adicionar concentrações crescentes de L-arg (2, 5 e 10 mM) no meio de capacitação de espermatozoides de búfalo não observaram alteração da motilidade progressiva após 6 h de incubação, no entanto, ao adicionar concentrações maiores de L-arg (> 10 mM) observaram uma diminuição da motilidade progressiva. No mesmo trabalho, foi analisado a fosforilação de resíduos tirosina de 38 kDa (p38), chave na sinalização intracelular de eventos que ocorrem durante a capacitação e regulada pelo NO. Comparada com o controle, a L-arg induziu a fosforilação da tirosina p38 e o L-NAME inibiu esse processo. No entanto, o

efeito inibitório do L-NAME foi revertido quando se adicionou L-arg ao meio, indicando que ocorre uma inibição competitiva da NOS constitutiva no espermatozoide (ROY e ATREJA, 2008). Assim, ao adicionar um análogo do AMPc (db-AMPc) com IBMX (inibidor da fosfodiesterase) não foi induzida a fosforilação da p38, sugerindo que a L-arg, induz a fosforilação da p38 independente do caminho AMPc/PKA.

Leal *et al.* (2009) demonstraram um aumento da motilidade progressiva a partir de 4 h, do vigor e integridade de membrana a partir de 15 min após a adição de 10 mM de L-arg no meio de capacitação espermática bovino, quando comparado com o controle. Mais recentemente, Jogan Mohanarao e Atreja (2011) demonstraram que a adição de 5 mM de L-arg, no meio de cultivo, aumentou a motilidade e capacitação espermática de búfalos após 6 h.

3.6. 8-bromo-GMPc (Br-GMPc)

O Br-GMPc é um análogo do GMPc, principal via utilizada pelo NO na capacitação espermática. O GMPc foi descrito como produto biológico em 1963 mas por muitos anos não foi considerado como segundo mensageiro (WALDMAN e MURAD, 1987). No entanto, os estudos foram demonstrando sua importância e, em 1997, ela foi detectada por imunohistoquímica em tubulos seminíferos de humanos (MIDDENDORFF *et al.*, 1997).

Santos-Sacchi e Gordon (1980) demonstraram que a adição de 10 mM de Br-GMPc, no meio de capacitação por 1 h, aumentou a RA em cobaias e Miraglia, (2011) concluiu que a adição de 500 µM de Br-GMPc, no meio de capacitação espermática por 30, 60 e 90 min, aumentou a motilidade de humanos comparado com o controle.

3.7. 1H-(1,2,4) oxadiazolo-(4,3-a)quinoxalin-1-ona (ODQ)

O 1H-(1,2,4) oxadiazolo-(4,3-a)quinoxalin-1-ona (ODQ) é um potente e seletivo inibidor da via GMPc solúvel (GARTHWAITE *et al.*, 1995). Ele age inibindo irreversivelmente a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), pela oxidação do grupamento heme dessa enzima (ZHAO *et al.*, 2000), responsável pela ativação do GMPc e seu efeito inibitório é tempo dependente (SCHRAMMEL *et al.*, 1996). No

entanto, Revelli *et al.* (2001) descreveram que sua inibição pode ser revertida com a utilização do Br-GMPc.

O ODQ tem sido utilizado juntamente com o Br-GMPc na busca de melhores entendimentos da via e mecanismos de ação do NO (GARTHWAITE *et al.*, 1995; SANTOS-SACCHI e GORDON, 1980; MIRAGLIA *et al.*, 2007, 2011). A adição de 50 $\mu\text{mol/L}$ de ODQ no meio contendo espermatozoides de humanos, por 20 min, diminuiu a concentração intracelular de GMPc enquanto que a adição de 1 mmol/L de Br-GMPc aumentou, comparado com o controle (MIRAGLIA *et al.*, 2007).

Além disso, após adicionar 10 μM de ODQ ao meio capacitante por 30, 60 e 90 min, houve uma diminuição da motilidade espermática em humanos (MIRAGLIA, 2011). No entanto, na mesma concentração, em bovinos, o ODQ não alterou a motilidade nem o vigor após 4 h de capacitação, mas aumentou a integridade de membrana plasmática, comparado com o controle (FERREIRA-BERBARI, 2008).

3.8. Motilidade progressiva

Segundo o *Manual para exame andrológico e avaliação para sêmen animal*, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1988), a motilidade progressiva é classificada de 0 a 100%, de acordo com a porcentagem de espermatozoides móveis associados com o movimento linear.

A porcentagem de espermatozoides móveis com motilidade progressiva depende do tempo de incubação no meio de capacitação espermática bovina *in vitro*. Ao longo da incubação, os espermatozoides vão se tornando capacitados, assumindo movimentos circulares, passando pela fase de hiperativação, até começar a diminuir sua motilidade progressiva.

A motilidade progressiva apresenta um decréscimo mais acentuado com o passar das horas, no meio contendo heparina, quando comparado com o meio de capacitação sem heparina (CHAMBERLAND *et al.*, 2001). O decréscimo da motilidade progressiva, na presença de heparina, é correspondente ao decréscimo da viabilidade e ocorre porque durante a capacitação os espermatozoides tornam-se cada vez mais frágeis, devido a várias alterações na membrana plasmática (HARRISON, 1996). Depois da capacitação, o espermatozoide exaure sua reserva energética que é vital para sua motilidade, devido ao efeito de aceleração do metabolismo espermático provocado pela heparina (CHAMBERLAND *et al.*, 2001).

Após três horas de capacitação, o semên apresenta 70,6% de espermatozoide com velocidade curvilínea (VCL) e 38,2% de espermatozoides com velocidade em linha reta (VSL) após serem incubados em TCM, meio de capacitação, quando comparados com controle, sem CaCl_2 e NaHCO_3 (VCL-57,1%; VSL-29,7%) (GARCÍA HERREROS *et al.*, 2005).

A adição de 10 mM de L-arg ao meio de capacitação aumentou a motilidade progressiva espermática quando comparado com o controle. Diferentemente, ao se adicionar 10 mM de L-NAME, a motilidade foi inibida. No entanto, a adição de 0,6 mM de L-arg ao meio capacitante contendo 10 mM de L-NAME não impediu o efeito inibitório na motilidade (LEAL *et al.*, 2009).

3.9. Hiperativação da motilidade espermática

A hiperativação da motilidade espermática ocorre durante a capacitação e é caracterizada por movimentos laterais em forma de “oito” (YANAGIMACHI, 1994). A hiperativação foi, inicialmente, descrita por Yanagimachi (1969). Ele propôs que o vigoroso movimento assumido pelo espermatozoide era vital no papel da penetração na zona pelúcida. Stauss *et al.* (1995) demonstraram que espermatozoides de hamster hiperativados tiveram maior sucesso na penetração da zona pelúcida de oócitos *in vitro*, quando comparados com espermatozoides não-hiperativados.

Vários componentes do trato reprodutor da fêmea podem servir como estímulo fisiológico para a hiperativação (SUAREZ e HO, 2003). No entanto, hormônios, íons e secreção do oviduto variam durante o ciclo estral da fêmea (NICHOL *et al.*, 1992) podendo, assim, existir um período ótimo para que esse processo ocorra.

O fluido folicular humano tem efeito dose-dependente na frequência do ritmo flagelar e hiperativação (YAO *et al.*, 2000), tendo sido sugerido que a progesterona é o fator ativo por induzir a hiperativação (SUELDO *et al.*, 1993).

Boatman e Robbins (1991) relataram a essencialidade do bicarbonato, tanto na capacitação espermática quanto na hiperativação *in vitro* de espermatozoides de hamster. No entanto, a hiperativação requer concentrações maiores de bicarbonato, quando comparado com a capacitação espermática. A hiperativação pode ocorrer independente da capacitação em espermatozoides de roedores. A procaína pode rapidamente iniciar a hiperativação em espermatozoides não-capacitados (MUJICA *et al.*, 1994; HO *et al.*, 2002). Desta maneira, a hiperativação e a capacitação podem

ser consideradas eventos independentes, que ocorrem, em geral, concomitantemente.

A adição de heparina no meio de capacitação *in vitro* acelera esse processo de hiperativação. No entanto, a função desses movimentos não direcionais ainda não está muito clara. Sabe-se que o Ca^{2+} extracelular é necessário para manter a hiperatividade, mas ainda não estão muito entendidos os mecanismos que estimulam o início da motilidade (HO *et al.*, 2002).

3.10. Vigor

A força do batimento da cauda do espermatozoide, denominada vigor, declina à medida que o espermatozoide vai se tornando capacitado. Isso se deve às mudanças ocorridas na superfície espermática.

Segundo o *Manual para exame andrológico e avaliação para sêmen animal*, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1988), o vigor é classificado de 0 a 5, de acordo com a força do batimento flagelar.

A adição de 10^{-3} M de nitroprussiato de sódio (SNP, doador de NO) no meio de capacitação espermática bovina diminuiu o vigor após 2 h de incubação, quando comparado com o controle e demais concentrações (10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} M); após 4 h de incubação apresentou uma maior diminuição do vigor (PAES de CARVALHO, 2002). Leal *et al.* (2009) demonstraram que a adição de 10 mM de L-arg ao meio de capacitação aumentou o vigor quando comparado com o controle. A adição de 10 mM de L-NAME inibiu o vigor. Contudo, ao se adicionar 0,6 mM de L-arg ao meio capacitante contendo 10 mM de L-NAME, o efeito inibitório foi impedido.

3.11. Membrana plasmática (MP)

Os espermatozoides de mamíferos são células altamente polarizadas (LADHA, 1998; JAMES *et al.*, 1999), consistindo de três partes: cabeça, peça intermediária e cauda. Estas partes são recobertas por uma membrana plasmática diferenciada que o subdivide em 5 regiões especializadas: acrossoma, região equatorial, pós-acrossoma, peça intermediária e peça principal (CASTELLINI *et al.*, 2006). Nestas células a MP participa diretamente do processo de fertilização, constituindo, portanto, o foco de diversas pesquisas (LADHA, 1998; CASTELLINI *et al.*, 2006).

Cada região possui uma função especializada, e a membrana associada apresenta uma composição de lipídios e proteínas apropriada para manter seu papel. Esta membrana modifica-se durante a maturação, principalmente com relação a sua estrutura e fluidez, para garantir que o material genético do espermatozoide possa se unir ao do oócito, garantindo a fertilização (LADHA, 1998; CASTELLINI *et al.*, 2006).

Para Ladha (1998), a organização de lipídios da membrana do espermatozoide é complexa. O duplo folheto não é, simplesmente, uma bicamada passiva de membrana lipídica em que receptores recebem seus sinais moleculares específicos, mas sim uma estrutura altamente especializada, assumindo um papel ativo na capacidade fertilizante, recebendo sinais e modificando-se ao longo do processo de espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, deposição no trato genital feminino e, finalmente, capacitação e penetração do oócito (BUHR *et al.*, 1994).

Alberts *et al.* (2004) relataram que as células espermáticas possuem membranas que apresentam certas diferenças, quando comparadas a outras células somáticas. Ladha (1998) e Alberts *et al.* (2004) descreveram que a membrana é subdividida nas diferentes porções da célula, diferindo em composição e função, sendo constituída de um mosaico de domínios (figura 03), estes representando em escala, pequena heterogeneidade na composição, forma e fluidez da membrana.

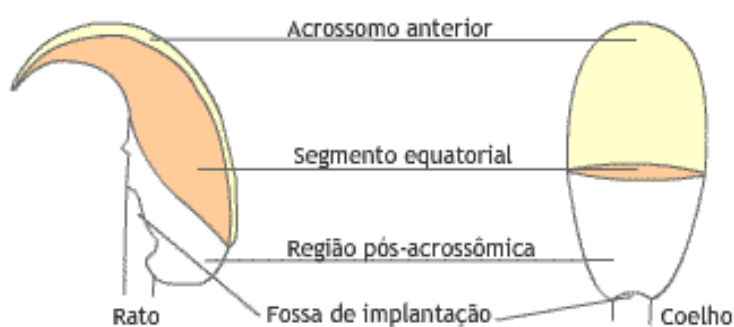


Figura 03- Domínios da membrana plasmática de rato e coelho (EDDY, 1988).

As principais regiões da superfície da cabeça, na maioria dos mamíferos, são: a região anterior do acrossoma, o segmento equatorial e a região pós-acrossômica (EDDY, 1988). A maioria dos domínios de superfície da membrana é estabelecida durante a espermiogênese, enquanto a espermátide redonda está sendo

remodelada até espermatozoide. Entretanto, algumas modificações podem ocorrer durante o trânsito no epidídimo, principalmente na peça intermediária e no acrossoma (EDDY, 1988).

A assimetria transmembrana do espermatozoide é estabelecida e mantida pela proteína ATP-dependente, aminofosfolípido translocase (MÜLLER *et al.*, 1999). Esta enzima rapidamente transloca a fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina da camada mais externa para a interna, garantindo a assimetria e conseqüentemente as diferenças de fluidez e estrutura de domínios (MÜLLER *et al.*, 1999; JANUSKAUSKAS *et al.*, 2003).

Durante o trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo, a membrana plasmática sofre modificações. Após deixarem os testículos, os espermatozoides interrompem a síntese de lipídios e proteínas, sendo estes organizados em regiões laterais da cabeça do espermatozoide (FLESCH e GADELLA, 2000).

3.11.1. Fosfolipídios dos espermatozoides

Assim como as outras células somáticas, os lipídios da membrana plasmática do espermatozoide são distribuídos assimetricamente na dupla camada (FLESCH e GADELLA, 2000), com alta proporção de ácidos graxos polinsaturados ligados a frações de fosfolipídios (LADHA, 1998). A percentagem de fosfolipídios é variável entre as espécies, haja vista que Aisen *et al.* (2005), verificaram que a razão de ácidos graxos insaturados/ saturados em membranas espermáticas de ovinos é maior do que em outras espécies, tornando-os mais susceptíveis aos processos oxidativos.

Quando se analisa especificamente algumas espécies animais, observa-se que em ovinos e caprinos as fosfatidilcolinas são encontradas na camada mais externa da célula espermática (LADHA, 1998). Já a fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e o fosfatidilglicerol são igualmente distribuídos entre as duas camadas do espermatozoide de ovino (LADHA, 1998). Fosfatidiletanolamina é o lipídio predominante da camada mais interna do espermatozoide caprino, enquanto que nos ovinos o fosfatidilinositol e o difosfatidilinositol predominam (LADHA, 1998).

Parks *et al.* (1987); Buhr *et al.* (1994) e Ladha (1998) ainda relatam que os fosfolipídios encontrados em maior concentração na membrana plasmática do espermatozoide são a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomiéline,

enquanto que o fosfatidilinositol, fosfatidilserina, difosfatidil glicerol e lisofosfatidil estão presentes em menor concentração. Já no coelho, Castellini *et al.* (2006) confirmam os achados dos fosfolipídios anteriormente citados e acrescentam a presença em concentração elevada, também do lisofosfatidil.

A cardiolipina não foi identificada na membrana plasmática de espermatozoides de bovinos, entretanto pode ser encontrada em espermatozoides do epidídimo de carneiros e cobaias, bem como em espermatozoides ejaculados de suínos. Isso se deve à composição dos fosfolipídios da membrana plasmática de bovinos diferir significativamente da de suínos e ovinos (PARKS *et al.*, 1987). A presença da cardiolipina nos carneiros, ovinos e cobaias parece estar associada à fusão de membranas levando à reação acrossômica (PARKS *et al.*, 1987).

Como exemplo, os espermatozoides humanos contêm 50% de fosfatidilcolinas, 30% de fosfatidiletanolamina, 12,5% de fosfatidilesfingomielina, 3% de fosfatidilserina, 2,5% de cardiolipina e aproximadamente 2% de fosfatidilinositol, sendo a composição de glicerídios fosfocolina e glicerídios fosfoetanolamina única nas células espermáticas (FLESCHE e GADELLA, 2000). Já Ladha (1998) relata que a esfingomielina de macacos *Rhesus*, caprinos e suínos possui menos ácidos graxos de cadeia polinsaturada, constituindo 10 a 15% do total de lipídios do espermatozoide, e a fosfatidilserina e o fosfatidilinositol, 4% e 3%, respectivamente. Ácidos graxos polienólicos de cadeia muito longa também estão associados à esfingomielina em ovinos, bovinos, ratos, suínos e humanos, aumentando durante a maturação para formar 5% do total de ácidos graxos (LADHA, 1998). Em suínos, Brouwers *et al.*, (2005) verificaram que os fosfolipídios das células espermáticas são extremamente ricos em ác. graxo insaturados, com até 5 ou 6 insaturações.

Embora a concentração de fosfatidilinositol represente apenas um pequeno percentual do total de fosfolipídios do espermatozoide de bovinos, a importância deste metabolismo em sinalização intracelular pode ser demonstrada, e parece estar relacionada a eventos associados com a reação acrossômica (PARKS *et al.*, 1987).

Torna-se interessante estudar a variação na composição lipídica da membrana, pois esta afeta significativamente a agregação membrana-membrana, bem como a fusão com o oócito (MÜLLER *et al.*, 1994). Por exemplo, a presença de fosfatidilcolina não favorece a agregação, pois esta se apresenta muito hidratada; já a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina são menos hidratadas, permitindo um contato maior entre membranas (MÜLLER *et al.*, 1994).

3.11.2. Glicolípídeos dos espermatozoides

Um particular glicolípídeo observado em vertebrados é o seminolípídeo, que é encontrado apenas em células espermáticas e de Schwann de mamíferos (LADHA, 1998; FLESCHE e GADELLA, 2000; BROUWERS *et al.*, 2005). Aproximadamente 98% de seminolípídeos possuem a estrutura de 1-O-hexadecil, 2-O-hexadecanoil, 3-3'-sulfogalactosil glicerol (FLESCHE e GADELLA, 2000). Além dos seminolípídeos, somente pequenos traços de outros glicolípídeos podem ser encontrados nos espermatozoides de mamíferos (LADHA, 1998; BROUWERS *et al.*, 2005); tal como o 1-O-alkil-2-O-acil-3- β -D-galactosil-sn-glicerol (LADHA, 1998).

Após a ejaculação, os seminolípídeos podem ser dessulfatados por arilsulfatases originadas das glândulas sexuais acessórias, estando envolvidos em certos processos da fertilização, principalmente na reação acrossômica e fusão com o oócito (LADHA, 1998). No ejaculado fresco os lipídios sulfatados estão concentrados na região apical (figura 04a), provavelmente prevenindo a reação acrossômica, uma vez que estabiliza a bicamada lamelar da membrana e previne o influxo de cálcio; após a capacitação, se localizam na região pós acrossomal (figura 04b) (FLESCHE e GADELLA, 2000; BROUWERS *et al.*, 2005).

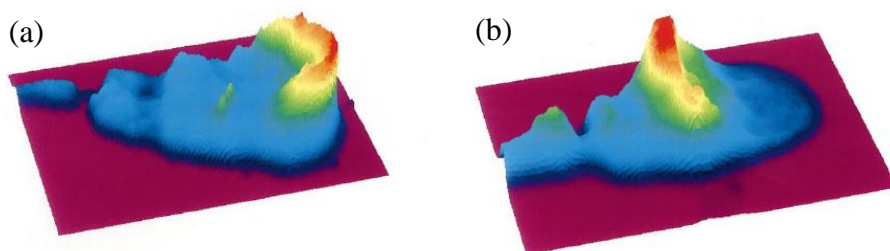


Figura 04-a) Fosfolípídeos fluorescentes da membrana do espermatozoide suíno, em que se mostra o espermatozoide do ejaculado fresco ; b) Espermatozoide após a capacitação (FLESCHE e GADELLA, 2000).

3.11.3. Esteróides dos espermatozoides

Grande variação na composição de lipídios neutros das membranas espermáticas pode ser encontrada entre as espécies, além de variar entre diferentes machos e ejaculados (FLESCHE e GADELLA, 2000). O principal fator variável é a quantidade de colesterol na membrana plasmática do espermatozoide. Células

espermáticas humanas contêm maior quantidade de colesterol (40 mol % dos lipídios totais) que as células de suínos (22 mol %) (FLESCH e GADELLA, 2000). O conteúdo celular de esteróides parece estar ligado à duração da capacitação, pois ocorre uma depleção de colesterol da membrana durante a capacitação (FLESCH e GADELLA, 2000).

O colesterol está presente em quantidades semelhantes aos fosfolipídios na membrana espermática (FLESCH e GADELLA, 2000), porém os lipídios sulfatados e esterificados estão presentes em menor concentração (LADHA, 1998; FLESCH e GADELLA, 2000). Esta quantidade é variável, de acordo com as diferentes regiões do espermatozoide, as espécies animais e indivíduos de uma mesma espécie (CROSS, 1998).

No entanto, Parks *et al.*, (1987) verificaram que o colesterol constituía menos de 1% dos esteróides totais, tanto na membrana plasmática quanto na membrana acrossomal externa de espermatozoides de mamíferos. Além disso, foi verificado um lipídio polar, solúvel em acetona e presente apenas na membrana plasmática, o sulfogalactolipídio, que representa aproximadamente 5% dos lipídios totais. Já Buhr *et al.*, (1994) demonstraram 83,7% de colesterol e 16,3% de demosterol, em relação aos esteróides totais, em espermatozoides de suínos.

Existem diferenças ainda na disposição do colesterol, sendo esta de considerável importância, uma vez que sua depleção é um importante passo na capacitação (LADHA, 1998). No hamster, o colesterol está presente em maior concentração na camada mais externa, recobrindo o acrossoma, enquanto que na cobaia e camundongo, na mais interna (LADHA, 1998). Já no homem, a pequena razão colesterol/ fosfolipídio parece estar correlacionada com a rapidez da capacitação, podendo explicar um aumento na fluidez da membrana, facilitando sua fusão com membrana acrossomal externa (LADHA, 1998).

A alta concentração de colesterol pode alterar a organização de domínios dos lipídios e diminuir a fluidez da região acrossomal, o que pode diminuir a velocidade de fusão da membrana durante a reação acrossômica (LADHA, 1998). Similarmente, os esteróides sulfatados inibem a reação acrossômica por inibir enzimas proteolíticas envolvidas neste evento (LADHA, 1998). Estes esteróides sulfatados são encontrados em alta concentração no epididímo, recobrindo as regiões acrossomal e peça intermediária (LADHA, 1998). Altas concentrações de colesterol também estabilizam as células espermáticas, resultando em uma melhor

criopreservação (BROUWERS *et al.*, 2005), uma vez que estabilizam a membrana e modulam a fluidez (CASTELLINI *et al.*, 2006).

3.11.4. Glicocálice x Capacitação

Durante o processo de capacitação, além de uma reorganização do glicocálice, ocorre também uma reorganização lateral das proteínas transmembrana na membrana plasmática da cabeça do espermatozoide. A membrana da cabeça do espermatozoide é separada da membrana da peça intermediária e restante da cauda por arranjos lineares de proteínas transmembrana formando o chamado anel posterior (FLESCH e GADELLA, 2000).

Os seminolípidios estão altamente concentrados na porção apical da cabeça em células não capacitadas, enquanto nas células capacitadas esta fração quase que inteira migra para a região equatorial. Estes lipídios assim como os demais estão confinados na camada externa da membrana e mais em contato com componentes do glicocálice. Reorganizações na polaridade lateral dos lipídios podem se originar de alterações nas interações dos seminolípidios do glicocálice (FLESCH e GADELLA, 2000).

Embora as propriedades de difusão lateral dos lipídios e proteínas livres da membrana variem consideravelmente entre os diferentes subdomínios da membrana da cabeça, isto não é devido ao fenômeno de separação de fases dos lipídios, mas provavelmente uma reflexão de composição de subdomínios de diferentes lipídios em consequência da regionalização do glicocálice (FLESCH e GADELLA, 2000).

Acredita-se que a organização polarizada do glicocálice seja importante para a heterogeneidade lateral dos lipídios na membrana da cabeça. Entretanto a capacitação dependente da reorganização da polaridade de lipídios reflete mudanças no glicocálice (FLESCH e GADELLA, 2000).

3.11.5. Fisiologia da membrana espermática e importância para fertilização

O espermatozoide tem uma superfície heterogênea com moléculas que se difundem lateralmente mantendo locais específicos (PHELPS *et al.*, 1988). Um reordenamento dessas moléculas ocorre quando o espermatozoide está perto do

oócito ou quando ele sofre capacitação adquirindo competência para a fertilização (GADELLA *et al.*, 1995).

Durante a capacitação ocorre uma reorganização das moléculas da superfície que é requerida para a união com a matriz extracelular do oócito (zona pelúcida), acumulando proteínas na crista apical da cabeça do espermatozoide. Nesta acumulação forma-se um complexo múltiplo de proteínas de união, as quais freqüentemente contêm componentes requeridos para a indução da reação acrosomal (SUAREZ, 2007).

Antes da fusão na fertilização, os espermatozoides precisam secretar suas enzimas acrossomais para penetrar a zona pelúcida (ZP). A reação acrosomal é a ligação de receptores espermáticos com a ZP, resultando na fusão em múltiplos pontos entre duas membranas próximas. No entanto, a interação espermatozoide-ZP é espécie específica e as proteínas identificadas para uma espécie podem não ser importantes para outra espécie (GADELLA *et al.*, 1995; SUAREZ, 2007).

3.11.6. Integridade da membrana espermática

A integridade da membrana é evidente parâmetro para ser avaliado, devido a seu requerimento essencial para o desenvolvimento das funções vitais das células (HARRISON e VICKERS, 1990). Para que o espermatozoide seja considerado viável e fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membrana plasmática normais (ZÚCCARI, 1998).

Durante a capacitação há um aumento da fluidez da membrana, remodelamento da superfície espermática, fosforilação de proteínas, hiperpolarização da membrana (STOREY, 1995) levando à diminuição da integridade (PARRISH *et al.*, 1988). Após três horas de incubação *in vitro*, em estufa a 38,5 °C, atmosfera umidificada, 95% de ar e 5% de CO₂, os espermatozoides bovinos tornam-se capacitados com elevada perda da integridade de membrana (PARRISH *et al.*, 1988). No entanto, esse tempo pode ser alterado adicionando-se substâncias ao meio de incubação que aceleram (NO, heparina, L-arg) ou retardam (L-NAME e L-NA) a capacitação espermática.

Leal *et al.* (2009) demonstraram que a adição de 10 mM de L-arg ao meio de capacitação aumentou a integridade de membrana a partir de 0,25 h de capacitação quando comparado com o controle. Já a adição de 10 mM de L-NAME diminuiu a

integridade de membrana após 3 h de capacitação. Contudo, ao se adicionar 0,6 mM de L-arg ao meio capacitante, contendo 10 mM de L-NAME, o efeito inibitório foi impedido a partir de 0,25 h.

A criopreservação também gera mudanças na fluidez da membrana plasmática dos espermatozoides, com redução significativa da difusão lipídica no acrossoma, região pós-acrossomal e peça intermediária (BUHR *et al.*, 1994; SPINACI *et al.*, 2005). Além disso, causa mudanças de fase na membrana e gera destruição de proteínas (MÜLLER *et al.*, 1999), visto que esta biotécnica leva ao “stress” osmótico, mecânico e químico das células espermáticas (MÜLLER *et al.*, 1999; PURDY *et al.*, 2005), potencialmente deletério às células espermáticas.

A distribuição de difosfatidilglicerol da bicamada se altera durante o processo de criopreservação (MÜLLER *et al.*, 1999), além de causar uma diminuição de esfingomiélin e aumento de fosfatidilcolina (BUHR *et al.*, 1994). Relata-se também a externalização da fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, o que pode ser revertido pela translocase ATP-dependente, porém normalmente esta se apresenta com função diminuída em células espermáticas criopreservadas (JANUSKAUSKAS *et al.*, 2003). Estas alterações na dinâmica levam à alteração na função das barreiras (GIRAUD *et al.* 2000) e perda de motilidade e viabilidade do espermatozoide, uma vez que altera a estrutura e funcionalidade da membrana plasmática (BUHR *et al.*, 1994).

3.11.7. Espécies de oxigênio reativas (ROS)

Espécies de oxigênio reativas (ROS, do termo em inglês: *reactive oxygen species*), radicais livres e oxidantes são termos usados para identificar os intermediários químicos reativos do metabolismo do oxigênio (NORDBERG e ARNÉR, 2001), contendo um ou mais elétrons desemparelhados na última camada (KEFER *et al.*, 2009).

Os ROS são encontrados em todos os sistemas biológicos e condições fisiológicas; o O₂ sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, neutralizando a reatividade da ROS, resultando na formação de H₂O (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Nesse processo são formados intermediários reativos como: radicais superóxido (O₂⁻), hidroxila (OH⁻), hidroperoxila (HO₂⁻) e o não radical peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Normalmente, a redução incompleta do O₂ ocorre na

mitocôndria levando a disfunções na cadeia transportadora de elétrons (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

No sêmen bovino as ROS são geradas primeiramente pelos espermatozoides mortos via reação catalizada pela enzima aminoácido aromático oxidase (SARIOZKAN *et al.*, 2009). Leucócitos e espermatozoides imaturos também podem gerar ROS (GARRIDO *et al.*, 2004). Particularmente os neutrófilos e macrófagos têm sido associados com a produção excessiva de ROS associada com disfunções espermáticas (SALEH *et al.*, 2002).

Os ROS são os grandes responsáveis pelos danos oxidativos podendo causar diversos distúrbios e levar à morte celular (MADAMANCHI *et al.*, 2005). Entretanto, os ROS nem sempre são metabólitos prejudiciais. Eles também podem agir como moléculas de sinalização intracelular (KILEY e STORZ, 2004), tendo um importante papel no processo fisiológico da capacitação espermática, reação acrossômica, manutenção da habilidade fertilizante, estabilização da cápsula mitocondrial da peça intermediária do espermatozoide bovino (AGARRAL *et al.*, 2008; DESAI *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2010). Também tem sido reportado que o O_2^- é requerido no último estágio do desenvolvimento embrionário assim como no embrião de duas células (KODAMA *et al.*, 1996).

Baumber *et al.* (2003), examinaram a influência dos ROS na capacitação do espermatozoide eqüino. A importância do H_2O_2 ou do O_2^- para a capacitação foi determinada pela adição de CAT ou SOD, respectivamente, contra um controle positivo em que a produção de ROS foi induzida pelo sistema xantina – xantina oxidase (X-XO). Os ROS gerados exogenamente pelo sistema X-XO promoveram a capacitação do espermatozoide equino, enquanto que a adição de CAT ou SOD preveniu o aumento do número de espermatozoides vivos com acrossomo reagido. Isso indica a participação tanto do H_2O_2 quanto do O_2^- na capacitação do espermatozoide equino. No espermatozoide de homens, Villegas *et al.* (2003) observaram um aumento na capacitação espermática (37% x 19% no controle) após a incubação dos espermatozoides com leucócitos ativados (fonte de ROS). Os resultados sugerem que a capacitação do espermatozoide humano pode ser induzida pelos ROS.

Em bovinos, Beorlegui *et al.* (1997) observaram que o sêmen do touro que apresentou maior susceptibilidade à lipoperoxidação e menor motilidade espermática possuía menor capacidade de passar pela reação acrossomal, induzida pelo cálcio

ionóforo, quando comparada com aqueles com menores níveis de peroxidação lipídica, revelando assim

que a peroxidação lipídica causa danos à membrana plasmática. Maior capacidade de passar pela reação acrossomal é observada naqueles espermatozoides com maior integridade de membrana plasmática, que possivelmente preservaram sua regularidade funcional.

3.11.8. Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é definida como “a deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados” (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1986). Ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono (H₂C=CH₂), sendo assim, excelentes alvos para o ataque de radicais livres (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

A lipoperoxidação é uma reação que ocorre em cadeia, passando pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (figura 05 - HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990). A iniciação ocorre pelo ataque a um lipídio por uma espécie de oxigênio reativo (ROS) que tenha reatividade suficiente para sequestrar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (CH₂) (GARDÈS-ALBERT *et al.*, 1991).

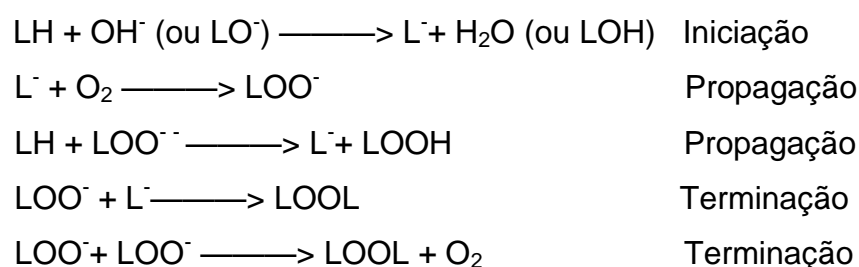


Figura 05- Etapas da reação em cadeia da lipoperoxidação, L: lipídio (GARDÈS-ALBERT *et al.*, 1991).

Tal sequestro pode ser realizado pelo OH[·] (radical hidroxila) ou pelo LO[·] (radical alcóxila), com formação do L[·] (radical lipídico) e H₂O. Na primeira equação de propagação, o L[·] reage rapidamente com o O₂, resultando em LOO[·] (radical peróxila), que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o L[·] na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação

ocorre quando os radicais L^{\cdot} e LOO^{\cdot} , produzidos nas etapas anteriores, propagam-se até destruírem a si próprios (SHAN, 1990). O NO é limitador da lipoperoxidação, agindo como uma espécie de terminador (RUBBO *et al.*, 1996).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies de oxigênio reativas (ROS), porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (MELLO FILHO *et al.*, 1983).

A membrana que rodeia as células e as organelas celulares contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, por isso, ela é um dos componentes celulares mais atingidos pelos ROS, em decorrência da peroxidação dos lipídios (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A peroxidação leva à perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos (malondealdeído - MDA), culminando com a morte celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

No entanto, assim como na formação das ROS, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na capacitação espermática, hiperativação, reação acrossomal, fusão com o oócito e na reação em cascata a partir do ácido aracônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1986). O excesso de tais produtos é que pode ser lesivo e causar danos celulares (ROSS e MOLDEUS, 1991).

A peroxidação lipídica descontrolada é altamente deletéria para o espermatozoide, afetando a motilidade (BEORLEGUI *et al.*, 1997), capacitação, morfologia espermática (de LAMIRANDE e GAGNON, 1999), viabilidade, aumentando os defeitos morfológicos na peça intermediária do espermatozoide (BANSAL e BILASPURE, 2007), diminuindo, com isso, a capacidade de fertilizar o oócito.

Assim, um importante sistema de defesa contra o aumento de radicais livres, impedindo que ocorra a peroxidação lipídica em excesso envolve os antioxidantes. Estes podem ser divididos em enzimáticos e não enzimáticos, podendo atuar como removedores de um agente que cause lesão ou mesmo como reparadores de uma lesão já ocorrida (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

3.11.9. Antioxidantes

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que retarda ou previne, significativamente, a oxidação de um substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

Em condições normais, os antioxidantes convertem as ROS em H₂O prevenindo sua superprodução. Por isso, em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre os agentes óxido-redutores (ROS) e o sistema de defesa antioxidante, pois, um desbalanceamento desse equilíbrio pode gerar o estresse oxidativo e culminar na peroxidação lipídica (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A célula possui um sistema de defesa antioxidante enzimático e um não enzimático para proteger-se do efeito letal da formação excessiva de ROS (SENTUERKER, 1997). O sistema enzimático é composto pelas enzimas glutathione redutase (GSH-Rd) e glutathione peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), ponto de maior relevância para este trabalho. Já o sistema não enzimático é formado por compostos de baixo peso molecular como principalmente as vitaminas C e E (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Esses sistemas podem atuar como removedores de agentes antes mesmo que eles causem lesão (GSH, SOD, CAT, GSH-Px e vit E) ou como reparadores da lesão ocorrida (vit C, GSH-Rd e GSH-Px) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

3.11.9.1. Antioxidante Enzimático

Também conhecidos como antioxidantes naturais, os antioxidantes enzimáticos neutralizam o excesso de ROS prevenindo, assim, danos na estrutura celular. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do ciclo redox da glutathione, particularmente a glutathione reduzida, glutathione redutase e glutathione peroxidase. Outros sistemas enzimáticos de defesa antioxidantes, operando em conjunto com as enzimas citadas anteriormente, incluem a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) (SENTUERKER, 1997).

3.11.9.1.1. Glutathione

A glutathione é um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina) existente no organismo em sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou

indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (MEISTER e ANDERSON, 1983). Meister (1983) descreveu que o sistema da glutatona é um dos maiores mecanismos de proteção do estresse oxidativo. Problemas na síntese e metabolismo da glutatona estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis de glutatona e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DENEKE e FANBURG, 1989).

3.11.9.1.2. Glutatona reduzida (GSH)

A glutatona reduzida está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (MEISTER e ANDERSON, 1983). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína (figura 06).

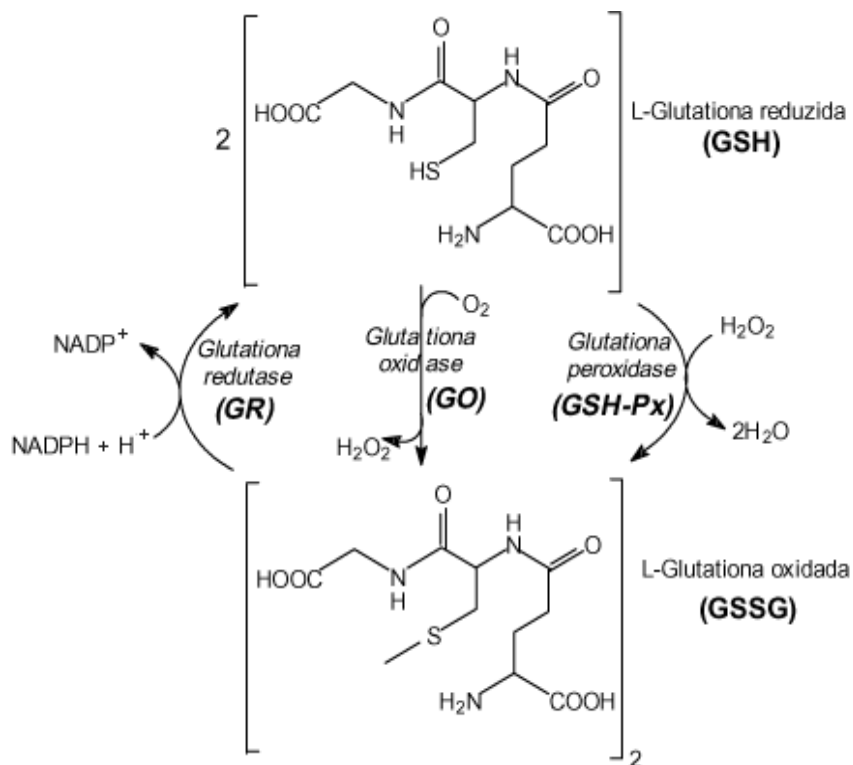


Figura 06- Interconversão da glutatona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas GSH-Px, glutatona oxidase (GO) e glutatona redutase (GR ou GSH-Rd) (MEISTER e ANDERSON, 1983).

A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro (GALLEANO e PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico, radiação e luz ultravioleta (DENEKE e FANBURG, 1989).

Além disto, ela atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda é requerida para a síntese de DNA, proteínas e algumas prostaglandinas (DENEKE e FANBURG, 1989).

3.11.9.1.3. Glutationa-redutase (GSH-Rd)

Esta enzima é uma flavoproteína que não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutatona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutatona, mantendo íntegro o sistema de proteção celular (MEISTER e ANDERSON, 1983). Sob condições de diminuição do fornecimento de NADPH, como no jejum e na deficiência de glicose- 6-fosfato desidrogenase (G6PD), há prejuízo da função da GSH-Rd (SHAN *et al.*, 1990).

Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG (HEBBEL, 1986). A recuperação da GSH é feita pela enzima GSH-Rd (figura 06), uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (GILBERT e MC LEAN, 1990). Habitualmente, a reserva intracelular de GSH-Rd é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos (FRISCHER e AHMAD, 1987).

3.11.9.1.4. Glutationa-peroxidase (GSH-Px)

A GSH-Px catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxido lipídico para seus correspondentes alcoóis pela conversão da GSH a GSSG (figura 06 - MEISTER e ANDERSON, 1983, SHAN *et al.*, 1990). Embora a GSH-Px tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (HEBBEL, 1986).

O selênio foi caracterizado como um componente essencial da GSH-Px (ROTRUCK *et al.*, 1973). Sua deficiência no organismo causa uma diminuição na atividade desta enzima em sua forma reduzida, e tem sido associada com alterações no metabolismo celular (HAYES *et al.*, 1991).

3.11.9.1.5. Superóxido dismutase (SOD)

Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD: forma SOD-cobre-zinco, que está presente principalmente no citosol, enquanto que SOD-manganês está localizada primariamente na mitocôndria (ARUOMA, 1989). Esta enzima tem papel antioxidante, já que catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ (ROSS e MOLDEUS, 1991). A presença desta enzima também protege o DNA de lesões provocadas pela sobrecarga de Fe^{3+} (ARUOMA, 1989).

3.11.9.1.6. Catalase (CAT)

A catalase é uma heme-proteína citoplasmática que age em conjunto com a SOD por catalisar a redução do H_2O_2 à H_2O e O_2 (MEISTER e ANDERSON, 1983) via reação Fenton (figura 07). Para aumentar sua eficiência e protegê-la da inativação, a catalase se liga ao NADPH (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NORDBERG e ARNÉR, 2001).

Ela é encontrada em todos os organismos aeróbicos atuando também na destoxificação de diferentes substratos (fenóis e álcoois) via redução acoplada do H_2O_2 . Pode ser encontrada no sangue, na medula óssea, nas mucosas, no rim e no fígado (WU *et al.*, 1990).

Lapointe *et al.* (1998) detectaram a atividade da CAT no fluido do oviduto de vacas, porcas e mulheres. Ao incubarem espermatozoides bovinos com fluido de oviduto purificado e com CAT de fígado de bovino, observaram que somente a CAT presente no fluido oviductual ligou-se ao acrossoma do espermatozoide. A presença de CAT no trato genital feminino de mamíferos pode ser relevante, uma vez que espermatozoides de mamíferos são deficientes em CAT. Além disso, aminoácidos do útero e oviduto de bovinos estimulam a produção de H_2O_2 pelos espermatozoides mortos. Como o H_2O_2 é um dos principais reagentes envolvidos na reação em cadeia,

que leva à peroxidação lipídica, esta enzima pode ser muito importante para a sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea.

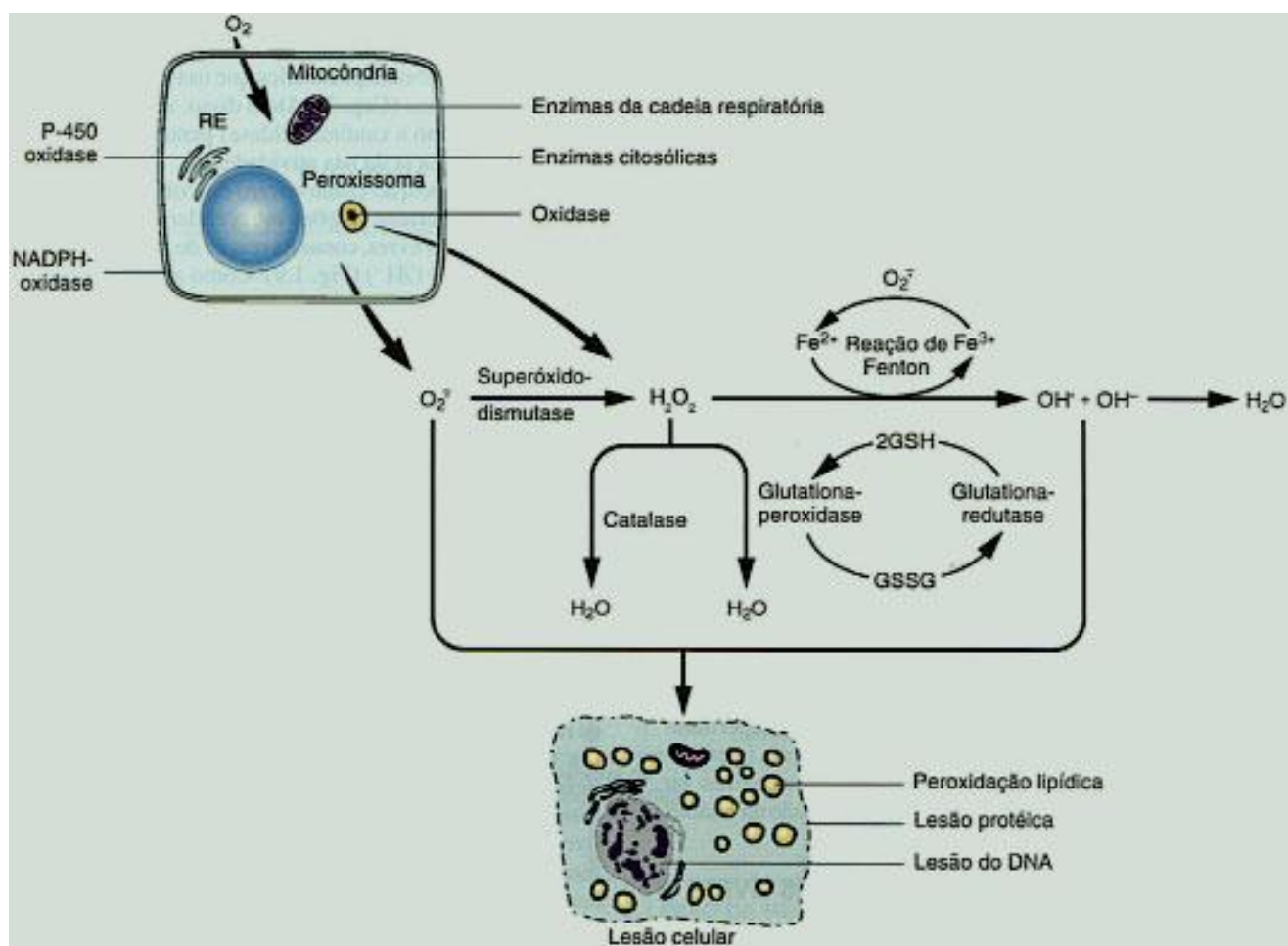


Figura 07- Sistema enzimático de defesa antioxidante representado pela ação conjunta da catalase e SOD (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

3.11.10. Estresse oxidativo

Um dos mais importantes fatores que contribuem para a baixa qualidade espermática tem sido reportado ser o estresse oxidativo (BUCAK *et al.*, 2010). O estresse oxidativo é consequência do desbalanceamento entre a produção de radicais livres e antioxidantes (DESAI *et al.*, 2010).

Distúrbios no balanço oxidante – antioxidante, em favor do oxidante, podem ser causados por redução na quantidade de antioxidantes nos sistemas de defesa celular ou por produção elevada de ROS, ou ambos (figura 08) (HALLIWELL e

GUTTERIDGE, 1990; SCANDALIOS, 2005). Tal estresse ocorre quando severas condições adversas ambientais ou fisiológicas sobrecarregam os sistemas biológicos, podendo levar a peroxidação lipídica (SCANDALIOS, 2005). Espermatozoides de mamíferos são extremamente sensíveis ao dano oxidativo por conter alta porcentagem de ácido graxo poliinsaturado e baixo nível de enzimas antioxidantes (ALVAREZ *et al.*, 1987), no entanto, todos os componentes celulares incluindo lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares são alvos potenciais do estresse oxidativo (AGARWAL *et al.*, 2008).

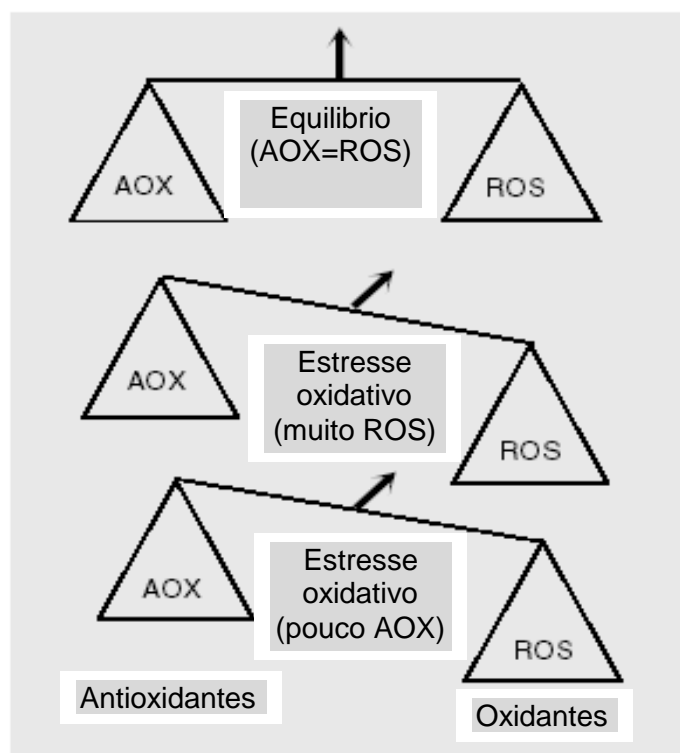


Figura 08- Representação do estresse oxidativo resultante do desbalançamento entre o nível de antioxidante (AOX) e espécies de oxigênio reativo (ROS), seja pelo excesso de ROS ou depleção de AOX (SCANDALIOS, 2005).

A formação de ROS pode ser acelerada pelo estresse ambiental em várias condições, incluindo a radiação UV, altas intensidades de luz, exposição a herbicidas, extremos de temperaturas, toxinas (cercosporina e aflatoxina), poluentes do ar, metais, ferimento, e xenobióticos (SCANDALIOS, 2005).

Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e depleção de GSH. Em situações em que o sistema de óxido-redução está íntegro, haverá recuperação da GS; entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou

deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo (SHAN, 1990; GILBERT e MC LEAN, 1990). Assim, a magnitude do estresse oxidativo pode ser monitorada pela razão GSSG/GSH (BEEHLER *et al.*, 1989).

O excesso de GSSG resulta em um ambiente mais oxidante favorecendo a formação de pontes dissulfeto (-SS-) nas proteínas portadoras de grupamento tiol (-SH) (GILBERT e MC LEAN, 1990). As pontes dissulfeto oxidam estas proteínas, com prejuízo de suas funções. Esta oxidação é reversível devido à ação de compostos antioxidantes, como a GSH (GILBERT e MC LEAN, 1990).

3.11.11. Danos causados ao espermatozoide pelos ROS

Altas concentrações de ROS no sêmen estão associadas com a diminuição do metabolismo energético do espermatozoide, da motilidade e viabilidade espermática e com a fragmentação do DNA em cavalos, touros, carneiros (GUNDOGAN *et al.*, 2010), bodes e homens (ARMSTRONG *et al.*, 1999; KRZYZOSIAK *et al.*, 2000).

Krzyzosiak *et al.* (2000) observaram um efeito deletério na motilidade e viabilidade de espermatozoides bovinos durante a incubação em temperatura ambiente, por nove dias, na presença de H₂O₂. Observaram também um aumento na desnaturação *in situ* do DNA espermático.

Armstrong *et al.* (1999) demonstraram a toxicidade do H₂O₂ ao espermatozoide humano pela inibição do movimento espermático e produção de energia (ATP). Duru *et al.* (2000) demonstraram que o estresse oxidativo, após a incubação do espermatozoide de homem com 100 ou 200 mM de H₂O₂, resultou em perda da motilidade e danos ao DNA.

Bilodeau *et al.* (2001), após adicionarem 100 mM de H₂O₂ ao sêmen de bovino, observaram uma diminuição da motilidade espermática. Em estudo posterior, Bilodeau *et al.* (2002) observaram que o H₂O₂ foi o responsável pela perda da motilidade do espermatozoide bovino, mas não alterou a viabilidade espermática.

Gundogan *et al.* (2010) demonstraram que a concentração espermática e os dias de estocagem de sêmen de carneiro, a 4^o C, ao longo de 5 dias, diminuíram a motilidade e viabilidade espermática e aumentaram o dano na morfologia e no DNA. Além disso, o declínio na qualidade foi mais acentuado quando as células espermáticas foram estocadas em menor concentração (25x10⁶ mL⁻¹) comparada

com $100 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. Essas alterações foram associadas ao plasma seminal e seus constituintes pela produção de ROS, sugerindo que o volume de plasma seminal ao redor de cada célula espermática pode variar de acordo com a concentração (KOMMISRUUD *et al.*, 2002).

3.11.12. Efeito da peroxidação lipídica na célula espermática

A peroxidação dos lipídios é uma causa particularmente importante de disfunção espermática. Os lipídios da membrana espermática são ricos em ácidos graxos poliinsaturados, os quais conferem a fluidez necessária para que ocorram os eventos de fusão de membranas associados com a fertilização (AITKEN, 1995). No espermatozoide oxidado, ocorre diminuição da fluidez da membrana, aumento da permeabilidade e diminuição da capacidade de fertilização (de LAMIRANDE e GAGNON, 1999). Além disso, existe uma relação negativa entre a lipoperoxidação no sêmen com a motilidade e morfologia espermática, sendo que a mesma pode ser controlada ou mesmo revertida pelo uso de antioxidantes no meio diluidor (de LAMIRANDE e GAGNON, 1999).

Aitken *et al.* (1993) mediram os níveis de peroxidação lipídica no sêmen de homens e correlacionaram os resultados com a morfologia espermática, as características do movimento e a capacidade de fusão espermatozoide-oócito. As células espermáticas oriundas da fração de baixa densidade de Percoll (espermatozoides anormais e mortos) produziram três vezes mais malonaldeído (MDA) que aquelas da fração de alta densidade (12,8 versus 4,4 nmol MDA/108 espermatozoides) indicando ter sofrido maior percentagem de lipoperoxidação.

A geração de MDA foi negativamente correlacionada com diversos parâmetros da motilidade espermática, entre eles percentagem de células rápidas; percentagem de células móveis e com a habilidade do espermatozoide de passar pela fusão esperma-ovócito. Engel *et al.* (1999) mediram a lipoperoxidação espontânea e induzida por ferro em amostras de sêmen de homens andrologicamente normais e observaram que os espermatozoides que apresentam uma baixa capacidade de manutenção da motilidade progressiva são mais susceptíveis ao processo de lipoperoxidação (46,9 x 72,0 nmol MDA/109 células, grupo normal x baixa SEM).

Beorlegui *et al.* (1997) observaram uma alta correlação negativa entre a produção de TBARS e a motilidade espermática bovina. As amostras de sêmen com

menor motilidade e vigor apresentaram maior porcentagem de lipoperoxidação ($4,95 \pm 0,31$ nmol TBARS/108 espermatozoides e $0,34 \pm 0,81$ nmol TBARS, respectivamente). Além disso, os espermatozoides, que apresentaram maior porcentagem de lipoperoxidação e menor motilidade, apresentaram também menor capacidade de sofrer reação acrossomal, induzida pelo cálcio ionóforo (BEORLEGUI *et al.*, 1997). Demonstraram, assim, que a peroxidação de lipídios causa danos à membrana plasmática, uma vez que maior capacidade de passar pela reação acrossomal é observada naqueles com maior integridade de membrana plasmática, que possivelmente preservaram sua regularidade funcional.

Guthrie e Welch (2006), após adicionar 300 μM de H_2O_2 no sêmen fresco de bovinos, observaram uma diminuição da motilidade espermática. A presença da CAT, durante a incubação com o H_2O_2 , inibiu o efeito deletério na motilidade, o que não foi observado ao incubar a SOD com H_2O_2 .

Sreejith *et al.* (2006) descreveram um aumento na produção de MDA por espermatozoides bovinos e de búfalos durante um período de 72 h de armazenamento em temperatura de refrigeração. Isso indica que os espermatozoides estavam sob aumento do estresse oxidativo durante o armazenamento, o que resultou em maior lipoperoxidação. No entanto, a atividade das enzimas antioxidantes foi menor em espermatozoides de búfalo comparando com bovino, indicando que eles eram mais propensos ao estresse oxidativo do que os bovinos.

Kasimanickam *et al.* (2006) avaliaram os níveis de lipoperoxidação no espermatozoide e no plasma seminal de cordeiros com exame andrológico satisfatório, questionável e insatisfatório. No grupo de animais com exame andrológico insatisfatório, a produção de MDA, tanto no plasma seminal quanto no espermatozoide, foi significativamente maior do que nos outros grupos, enquanto que a porcentagem de células morfologicamente normais e com motilidade progressiva foi menor. O nível de MDA no plasma e no espermatozoide foi negativamente correlacionado com a motilidade e a morfologia espermática (KASIMANICKAM *et al.*, 2006).

No sêmen de carneiros incubados a 37°C , por 120 minutos, no meio Tris-gema com ou sem antioxidantes, Sarlos *et al.* (2002) observaram um aumento da concentração de MDA nas amostras controle (sem antioxidante) durante o período de incubação, enquanto que nas amostras com antioxidante, exceto para a vit E, os níveis de MDA se mantiveram mais baixos e semelhantes, no mesmo período. No

grupo controle, a concentração de MDA foi de 25,89; 36,91 e 49,57 nmol MDA/109 espermatozoides, aos 30, 60 e 120 minutos de incubação, respectivamente. Nas amostras contendo o antioxidante resveratrol, os níveis de MDA foram: 3,69; 3,74 e 3,74 nmol MDA/ 109 espermatozoides, nos tempos acima mencionados.

No sêmen de varrão incubado por cinco dias em meio com ou sem vit E (a-tocoferol), Ceroline *et al.* (2000) observaram que houve incorporação do a-tocoferol à membrana espermática e sua relação com uma grande redução na susceptibilidade à lipoperoxidação. No quinto dia de incubação, a quantidade de MDA no grupo controle foi de 28,6 mg MDA/109 espermatozoides, significativamente maior que do no grupo tratado (6,5 mg MDA/109 espermatozoide).

3.11.13. Avaliação do estresse oxidativo e peroxidação lipídica (avaliação das ROS, atividades enzimáticas e tripeptídeos)

A detecção direta das ROS em sistemas biológicos é dificultada por suas concentrações extremamente baixas (da ordem de 10^{-11} M) e por suas altas velocidades de reação, chegando ao ponto de as taxas de produção serem iguais às taxas de reação com biomoléculas (FLOYD, 1990). No entanto, os subprodutos das ROS podem ser aferidos diretamente por técnica de ressonância paramagnética de elétrons, porém o custo e outras limitações dificultam seu uso rotineiro (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A técnica mais comum usada para medir a lipoperoxidação é o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), que é um método espectrofotométrico, que mede a concentração dos produtos oriundos da peroxidação dos lipídios. Esse método se baseia na quantificação do complexo formado pela reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (SHARMA e AGARWAL, 1996) com uma de malonaldeído (MDA) (JENTZSCH *et al.*, 1996; LAPENNA *et al.*, 2001), formando um cromógeno de coloração rósea, o qual é quantificado num comprimento de onda de 532 nm (MAIA, 2006). A vantagem desse método é poder estimar a peroxidação lipídica em uma população de células e a desvantagem é a não distinção entre células vivas e mortas, não podendo estimar a proporção de células vivas que sofreram peroxidação lipídica em suas membranas (GUTHRIE e WELCH, 2007).

Já para aferição indireta das ROS e das lesões oxidativas, os métodos mais comuns utilizados são os espectrofotométricos e cromatométricos, que medem a

atividade enzimática (SOD, catalase, GSH-Px e GSH-Rd) e/ou a concentração de tripeptídeos (GSH, GSSG) e aldeídos (MDA). O estresse oxidativo é habitualmente monitorado por dosagens de GSSG e/ ou pelo cálculo da razão GSSG/ GSH (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Atualmente existem diferentes métodos analíticos utilizados na determinação de glutathiona, procurando correlacionar os níveis desse importante tripeptídeo e enzimas que fazem parte deste ciclo metabólico com o sistema antioxidante (JUNIOR *et al.*,

2001). Na avaliação do estresse oxidativo, pode-se estudar as variações das concentrações das principais enzimas e substratos do ciclo catalítico da glutathiona, porém esta não é uma tarefa simples, devido ao fato de haver muitas interações químicas entre estas espécies (JUNIOR *et al.*, 2001). Na prática, o que se faz é tentar estabelecer algumas substâncias indicadoras associadas ao estresse oxidativo e cujas concentrações no organismo possam ser relevantes ao diagnóstico clínico (JUNIOR *et al.*, 2001).

Os métodos mais empregados para determinação de glutathiona são baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção espectrofluorimétrica (MANSOOR, 1992) ou eletroquímica (HALBERT e BALDWIN, 1985). A maioria destes métodos cromatográficos envolve a derivatização da glutathiona com agentes seletivos para tióis entre os quais os mais usados são o *o*-ftaldialdeído (OPA) e o mono-bromobimano (m-BBr). Entretanto, tióis reagem não seletivamente com ambos os reagentes, sendo necessário aplicar técnicas de separação para evitar ou minimizar possíveis interferências. Por isso, tem aumentado o interesse em eletroforese capilar para análise de tióis com detecção feita por espectrofotometria UV a baixos comprimentos de onda (PICCOLI *et al.*, 1994) e por fluorescência induzida por laser após derivatização da amostra (ORWAR *et al.*, 1995).

Alguns métodos espectroanalíticos também vêm sendo desenvolvidos na determinação de glutathiona, onde a amostra é convertida ou em um complexo colorido, empregando-se para isso substâncias cromogênicas (RAGGI *et al.*, 1991) ou por meio de adutos com propriedades espectrofluorimétricas (COHN e LYLE, 1966). Neste último caso, os agentes mais empregados na reação com a glutathiona é o OPA e o m-BBr (figura 9), muito utilizados em etapas de derivatização da amostra nos métodos cromatográficos.

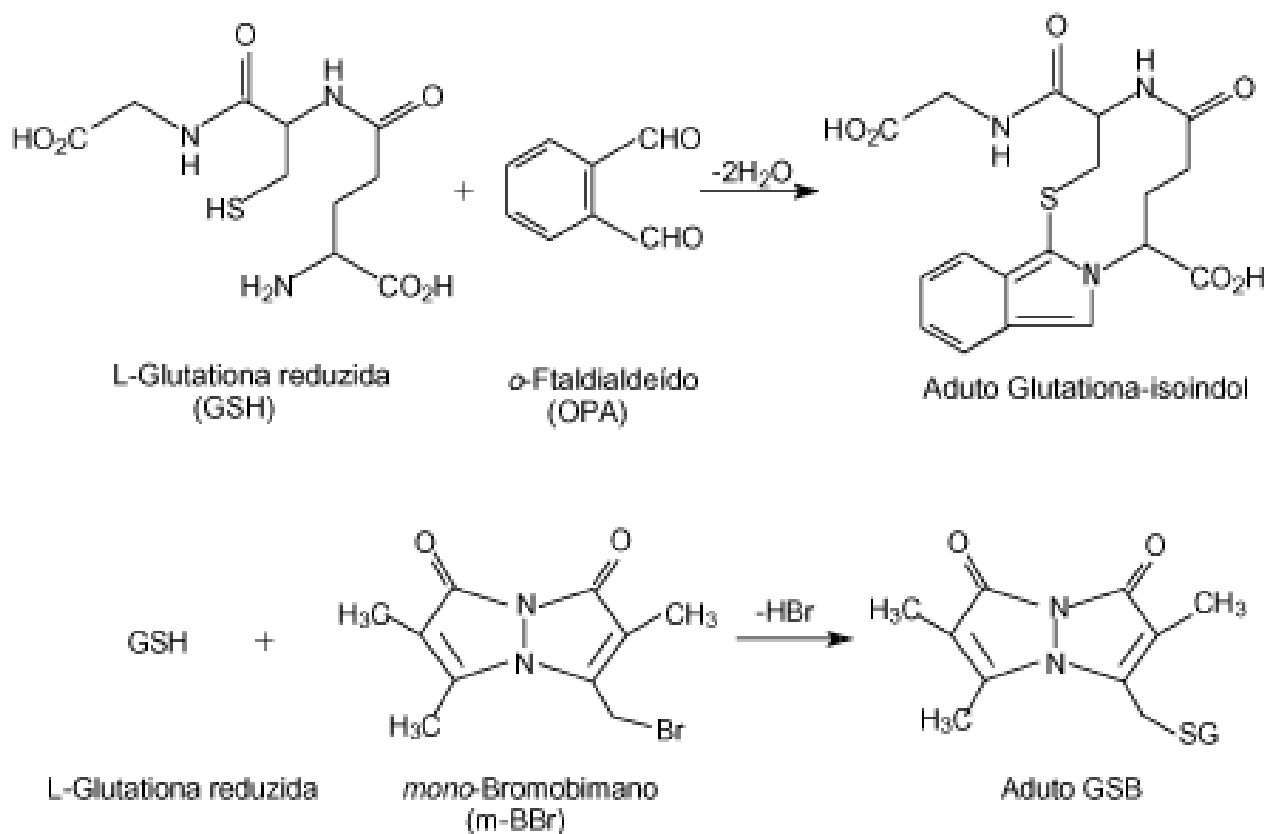


Figura 09- Esquema de diferentes reações de derivação para glutathiona empregando reagentes seletivos para determinação espectrofluorimétrica de tiois: (I) OPA (II) m-BBr (COHN e LYLE, 1966).

Reações enzimáticas têm sido descritas tanto na determinação de glutathiona como também de hidroperóxidos. Para exemplificar, algumas enzimas que foram usadas para tais análises incluem glutathiona peroxidase (HEATH e TAPPEL, 1976), "horseradish" peroxidase (GUILBAULT *et al.*, 1968) e ciclooxygenase. Citocromo c (MARSHALL *et al.*, 1985) e microperoxidas (MIYAZAWA *et al.*, 1987) e têm sido aplicadas na detecção de hidroperóxidos por quimiluminescência combinada com HPLC (JUNIOR *et al.*, 2001).

Foi reportado na literatura apenas um sensor potenciométrico usado na determinação enzimática da glutathiona (COMPAGNONE *et al.*, 1991). Este método, que utiliza a enzima glutathiona transferase (GST), se baseia na capacidade desta enzima de promover a associação de glutathiona (GSH) com metabólitos potencialmente perigosos para os seres vivos, permitindo assim a excreção destas substâncias nocivas à saúde. O substrato normalmente usado para detectar

glutathione, empregando esta técnica, é o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno, que se associa com GSH liberando em solução íons H^+ e Cl^- , que podem ser monitorados indiretamente com o auxílio de eletrodos íon-seletivos (figura 10) (COMPAGNONE *et al.*, 1991).

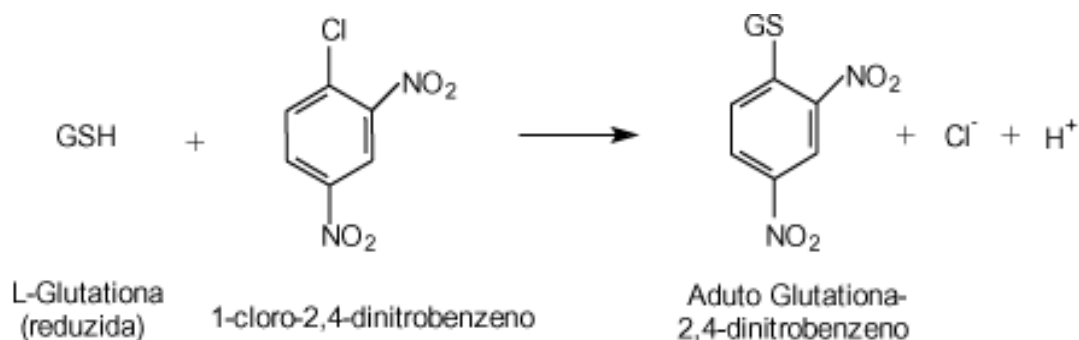


Figura 10- Reação utilizada na determinação potenciométrica da glutathione reduzida envolvendo 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e a enzima glutathione transferase (COMPAGNONE *et al.*, 1991).

Mori *et al.* (1992) descreveram a determinação enzimática não da glutathione, mas sim de hidroperóxidos envolvendo a imobilização de glutathione peroxidase com glutaraldeído e N-(2-aminoetil)-3-aminopropila suportados em esferas de vidro. Um sistema em fluxo com detecção espectrofotométrica é utilizado para monitorar diferentes hidroperóxidos como co-substratos da glutathione, empregando-se como substância cromogênica, o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB. A quantidade de hidroperóxidos é medida indiretamente pela diminuição da quantidade de GSH, avaliada pela diminuição da absorvância a 412 nm, resultante da reação de glutathione com DTNB que gera o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de coloração amarela (figura 11).

A quantificação de hidroperóxidos orgânicos pode ser também útil no diagnóstico de alguns processos de lipoperoxidação de membranas celulares, DNA e proteínas. Normalmente, os organismos vivos possuem mecanismos de defesa eficientes contra a ação de espécies reativas de oxigênio, porém toda vez que houver um desequilíbrio entre a produção de hidroperóxidos e os sistemas de defesa, estará estabelecido também um estresse oxidativo (SIES *et al.*, 1986).

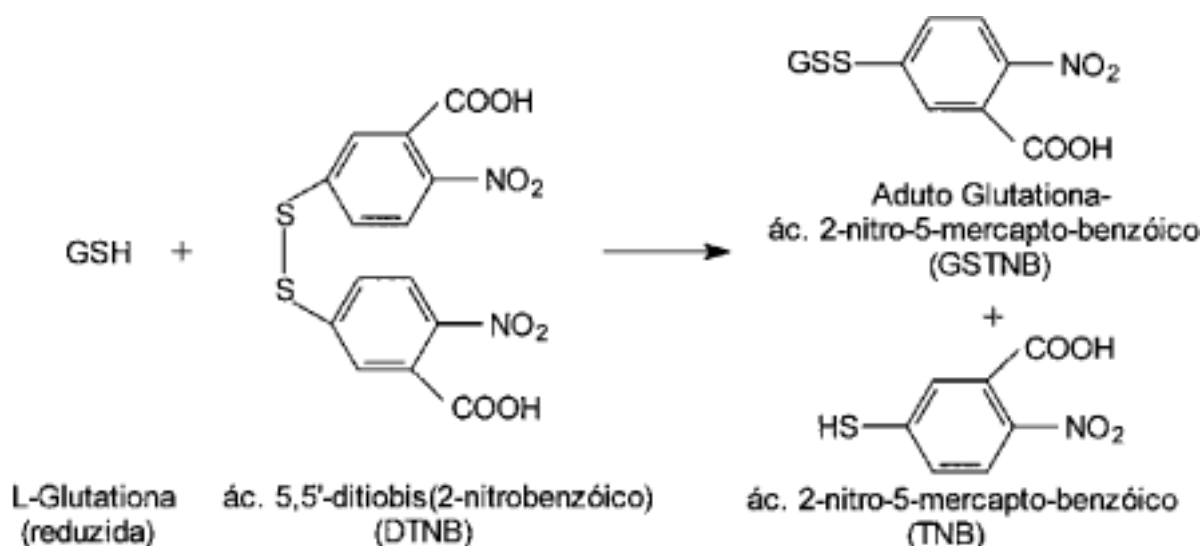


Figura 11- Reação entre a glutathiona reduzida e DTNB (reagente de Ellman) para a determinação de hidroperóxidos, empregando a enzima glutathiona peroxidase (MORI *et al.*, 1992).

3.11.14. Localização da peroxidação na célula espermática

O método de quantificação da peroxidação lipídica é limitado na medida em que não nos permite avaliar onde está ocorrendo essa oxidação na célula espermática e em que subpopulação de células presente na realidade acontece (BROUWERS *et al.*, 2005). No entanto, um análogo do ácido graxo, o 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3^a,4^a-diaz-a-s-indacene-3-undecanoic acid, C11-BODIPY^{581/591} (BODIPY), foi descrito como tendo propriedades de alterar irreversivelmente sua fluorescência em células vivas (PAP *et al.*, 1999) de acordo com os eventos da peroxidação lipídica (DRUMMEN *et al.*, 2004). A probe intacta fluoresce vermelho quando intercalada na membrana mudando para laranja após a oxidação do peroxinitrito e para verde após o ataque com outros radicais oxidativos (DRUMMEN *et al.*, 2004).

Essa sonda é adequada para a quantificação sensível da peroxidação lipídica e pode até mesmo ser usada para distinguir quantitativamente a peroxidação lipídica mediada por peroxinitrito da peroxidação lipídica mediada por outros ROS (figura 12 – GUTHRIE e WELCH, 2007). Seu uso pode ter relevância fisiológica na avaliação celular após exposição a fosfolípidios e ROS (DRUMMEN *et al.*, 2004).

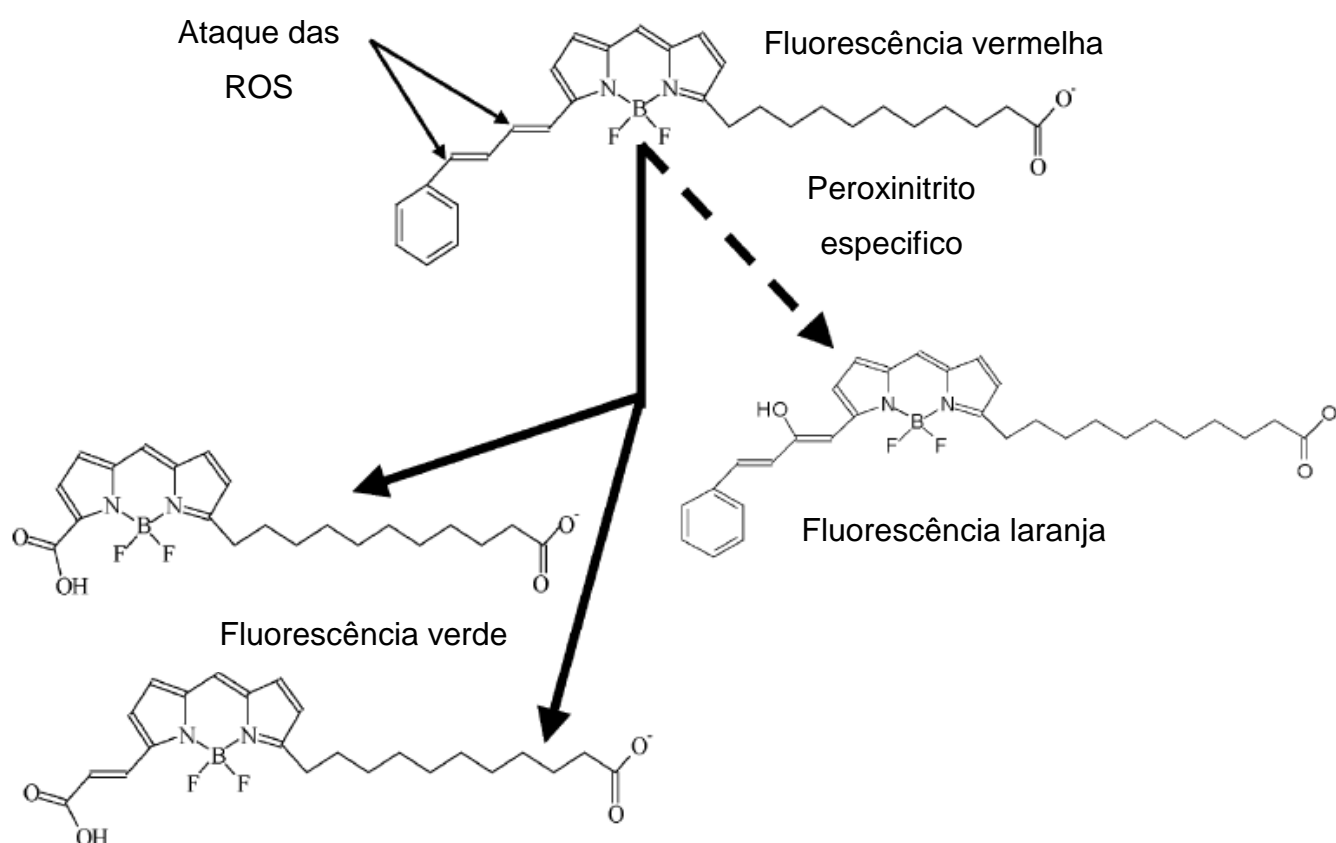


Figura 12- Propriedades fluorescentes do C11-BODIPY^{581/591} e seu produto da oxidação (DRUMMEN *et al.*, 2004).

Roca *et al.* (2004) observaram um aumento da peroxidação lipídica em sêmen de bovinos criopreservados avaliados pela formação de 3 vezes mais MDA comparado com sêmen fresco. Em contraste, o nível de peroxidação lipídica espontânea foi baixo nas células viáveis. Ao avaliar os espermatozoides pela probe C11-BODIPY^{581/591}, observaram que grande parte da peroxidação lipídica avaliada pelo MDA era produzida por espermatozoides não viáveis.

A C11-BODIPY^{581/591} pode ser usada para localizar a peroxidação em um único espermatozoide (auxílio de um microscópio confocal de varredura a laser) e para detectar subpopulações de células espermáticas com variação na sensibilidade para peroxidação lipídica usando a citometria de fluxo (BROUWERS e GADELLA, 2003).

A peroxidação lipídica é mais proeminente na peça intermediária, em menor percentagem na parte posterior da cauda e praticamente ausente na cabeça do espermatozoide de humano (BROUWERS *et al.*, 2005) e de garanhão (NEILD *et al.*,

2002). A indução da peroxidação lipídica mostrou que a cabeça do espermatozoide é bastante resistente a este tratamento, enquanto a cauda e a peça intermediária são mais sensíveis (BROUWERS *et al.*, 2005).

Além disso, a peroxidação lipídica é aumentada dramaticamente após o processo de congelamento - descongelamento. Brouwers *et al.* (2005), após testar esta sonda, C11-BODIPY^{581/591}, em espermatozoides de suíno e javali, observaram que a maioria das células não foi corada de verde. Entretanto, algumas células fluoresceram laranja na peça intermediária (após o descongelamento) e na gota citoplasmática (figura 13). Logo, o C11-BODIPY^{581/591} pode ser usado tanto para quantificar como para qualificar a peroxidação lipídica.

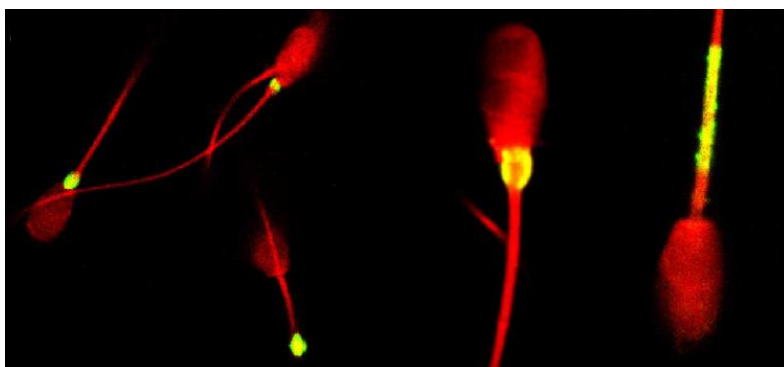


Figura 13- Espermatozoides de suínos corados com C11-BODIPY^{581/591}, avaliados com microscópio confocal de fluorescência (BROUWERS *et al.*, 2005).

3.12. Mitochondria

Os espermatozoides são células metabolicamente ativas que realizam tanto a glicólise anaeróbica como a respiração mitocondrial, mantendo um adequado balanço energético necessário para sua motilidade e as demais funções celulares (BARBOSA e ESPER, 1997).

Localizadas na peça intermediária do espermatozoide, as mitocôndrias são organelas semi-autônomas encontradas no citoplasma de quase todas as células eucariotas. Essa organela pode variar de tamanho, forma, peso e distribuição (MAY-PANLOUP *et al.*, 2010). O conhecimento atual do papel das mitocôndrias nas alterações patológicas tem se expandido rapidamente. As disfunções desta organela são responsáveis por alterações que podem levar a diversas patologias. Os órgãos

ou células envolvidas nestas síndromes são aqueles que demandam grande quantidade de energia respiratória (RUIZ-PESINI *et al.*, 1998).

A mitocôndria é a principal organela responsável pela produção de energia, 90% da produção de energia celular, a qual ocorre por meio do processo de fosforilação oxidativa (COPELAND, 2002). A energia é produzida em forma de adenosina trifosfato (ATP) que é quebrada em moléculas de adenosina bifosfato (ADP), pela adenosina trifosfatase, liberando a energia necessária para movimentação da cauda (BARTH e OKO, 1989). Esta organela é chave para a manutenção energética da motilidade espermática, um dos maiores determinantes da fertilidade do macho (RUIZ-PESINI *et al.*, 1998). Alterações no funcionamento da mitocôndria pode ser um fator relacionado à infertilidade (GRAVANCE *et al.*, 2000).

O comprimento da peça intermediária dos espermatozoides tem sido considerado indicador biológico que pode ser usado como preditor de características reprodutivas importantes em bovinos (LUKEFAHR e HOHENBOKEN, 1981). A peça intermediária é composta de mitocôndrias circundando a região proximal do flagelo, sendo possível que um aumento no seu comprimento poderia estar associado a uma maior taxa de fosforilação oxidativa com maior atividade metabólica, influenciando a motilidade ou vitalidade da célula, já que as mitocôndrias são geradoras de energia (EDDY, 1988).

As mitocôndrias são consideradas fornecedoras de energia (ATP) para os processos de limpeza das membranas da cabeça e peça intermediária (SILVA e GADELLA, 2006). Entre eles, o mais importante processo de limpeza consumidor de ATP é o gradiente de Na^+/K^+ sobre a membrana plasmática (SILVA e GADELLA, 2006). A Na^+/K^+ ATPase envolvida também indiretamente no transporte de outras unidades regula o gradiente químico e elétrico da membrana plasmática externa (SILVA e GADELLA, 2006). A integridade funcional da mitocôndria pode ser importante para a sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea ou durante as técnicas de reprodução assistida (SILVA e GADELLA, 2006).

3.12.1. Síntese de ATP

O ciclo do ácido cítrico e a β -oxidação são as duas mais importantes formas de geração de adenosina trifosfato mitocondrial (ATP_{mt}), que precedem a fosforilação oxidativa, o maior gerador de ATP, por meio da cadeia de transporte de elétrons (ST

JONH *et al.*, 2005). A proteína constituinte do processo de fosforilação oxidativa é única e diferente de qualquer outro tipo de mecanismo celular, a qual é codificadas pelo genoma nuclear e mitocondrial (MAY-PANLOUP *et al.*, 2010).

Segundo May-Panloup *et al.* (2010) e Szeto (2006), o sistema de transporte de elétrons é composto de quatro complexos enzimáticos localizados na membrana mitocondrial interna e uma ATP sintase responsável pela geração de moléculas de ATP através da fosforilação oxidativa. Os complexos I a IV constituem a cadeia respiratória, com função de transferir os elétrons das coenzimas redutoras (figura 14). O complexo I oxida a dinucleotídeo adenina nicotinamida fosfato (NADH) e o II oxida adenina flavina dinucleotídeo (FADH₂). Tanto o complexo I quanto o complexo II transferem elétrons para a ubiquinona. Esta é reduzida e transfere elétrons para o complexo III que, por sua vez, reduz o citocromo c, transferindo elétrons para o complexo IV reduzir o O₂ para prodzir H₂O. Proteínas presentes nesses quatro complexos são codificadas tanto no DNAm_t como no DNA nuclear (MAY-PANLOUP *et al.*, 2010).

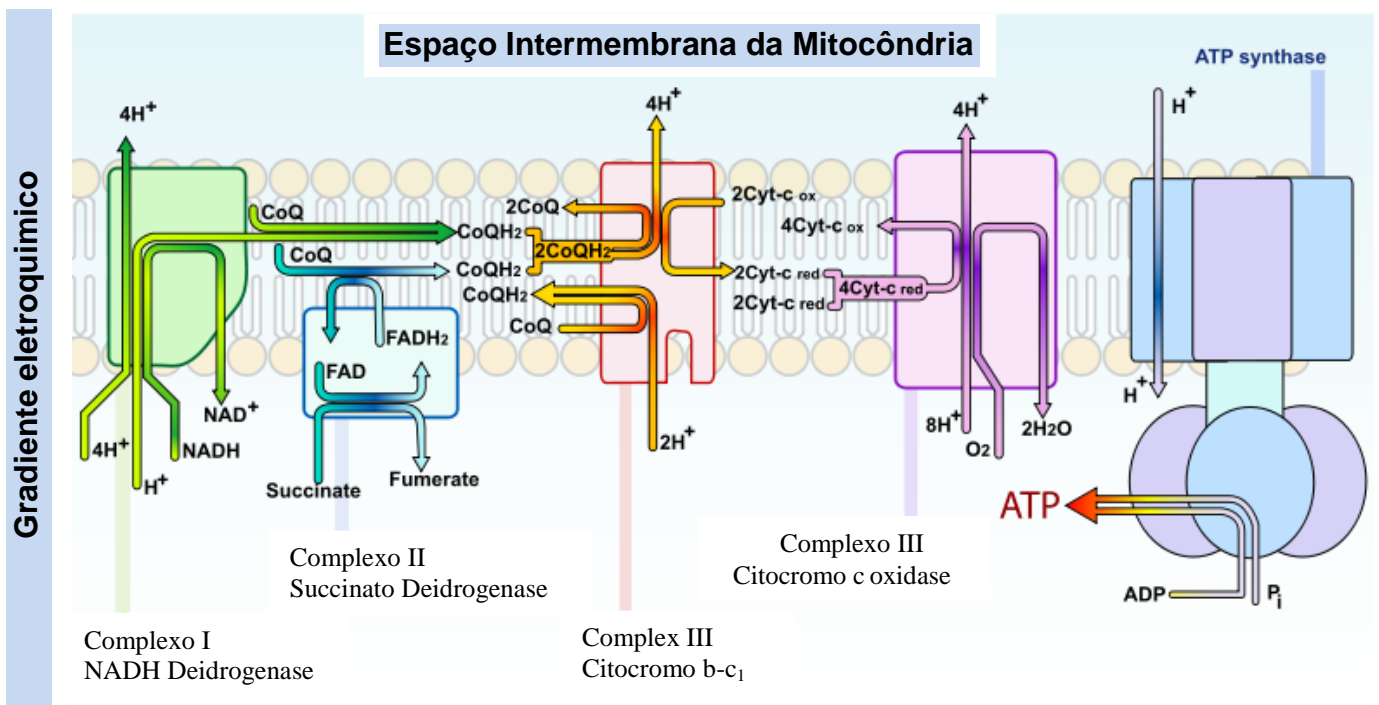


Figura 14- Cadeia transportadora de elétrons no espaço intermembrana da mitocôndria com consequente síntese de ATP (SZETO, 2006).

A transferência de elétrons ao longo da cadeia respiratória é usada pelos complexos I, III e IV para expelir prótons no espaço intermembranas gerando um gradiente energético proteômico e um potencial de membrana ($\Delta \psi$) (MAY-PANLOUP *et al.*, 2010). O complexo V, ou adenosina trifosfato (ATP sintase), capta prótons da matriz mitocondrial para a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (MAY-PANLOUP *et al.*, 2006). Essa energia produzida em forma de ATP é essencial para sobrevivência da célula, crescimento, divisão e outras funções variadas (MAY-PANLOUP *et al.*, 2010).

A energia liberada durante as reações de oxidação na cadeia respiratória mitocondrial é armazenada como um gradiente eletroquímico que consiste de um potencial elétrico transmembrana ($\Delta \psi$), negativo, cerca de 180-200 mV, e de um gradiente de próton (COSSARIZZA, 2007). Esta energia é capaz de conduzir a síntese de ATP para ser utilizada como combustível nos processos celulares.

Cátions lipofílicos membrana-permeáveis, denominados de sondas, acumulam-se em células vivas, organelas e lipossomos, exibindo um potencial de membrana negativo e têm sido utilizados para decifrar os mecanismos de regulação e controle da transdução energética (COSSARIZZA, 2007). Estas sondas incluem as que apresentam atividade óptica e fluorescente após acumulação em sistemas energizados, sondas rádio-coradas e sondas não coradas utilizadas com eletrodos específicos, sendo utilizadas para avaliar a atividade mitocondrial da célula (COSSARIZZA, 2007).

Alterações no potencial da membrana mitocondrial podem ser um bom indicador da diminuição da função mitocondrial (PEÑA *et al.*, 2003). Alto $\Delta \psi$ tem sido associado com aumento da qualidade do espermatozoide humano e taxa de fertilização (DONNELLY *et al.*, 2000). Carreira (2008) demonstrou que espermatozoides com gota citoplasmática apresentaram atividade mitocondrial menor que o controle (espermatozoides normais).

3.12.2. Efeito do óxido nítrico (NO) na respiração mitocondrial

O primeiro alvo da ação citotóxica do NO é a mitocôndria (HIBBS *et al.*, 1987; LANCASTER e HIBBS, 1990; MONCADA *et al.*, 1991). Lancaster e Hibbs (1990) demonstraram que a iNOS catalisa reações químicas da inibição mitocondrial dentro

de fontes celulares e, potencialmente, causa efeitos tóxicos nas células - alvo. Entretanto, os efeitos do NO também podem ser regulatórios ao invés de deletérios.

O NO pode inibir a fosforilação oxidativa de maneira reversível, por meio da regulação da concentração de cálcio intracelular (LAFFRANCHI *et al.*, 1995; SCHWEIZER e RICHTER, 1994). Adicionalmente, a nitrosilação do citocromo C inibe a atividade da citocromo oxidase reversível (CASSINA e RADI, 1996; CLEETER *et al.*, 1994; PODEROSO *et al.*, 1996; LIZASOAIN *et al.*, 1996; ROUSSEAU *et al.*, 1998). A enzima volta para o estado ativo quando o NO é reduzido a produtos nitrogenados por elétrons da cadeia respiratória (BORUTAITE e BROWN, 1996; CLARKSON *et al.*, 1995).

Ghafourifar e Richter (1997) e Giulivi *et al.* (1998) descreveram a produção mitocondrial de NO por uma isoforma especializada, a óxido nítrico sintase mitocondrial (mtNOS). Ela possui ação clássica como a óxido nítrico sintase (NOS), precisando de NADPH, arginina, O₂ e Ca²⁺/calmodulina para sua atividade enzimática (TATOYAN e GIULIVI, 1998) e regula a respiração celular (LOPEZ-FIGUEROA *et al.*, 2000).

Sob condições aeróbicas, o O₂⁻ é formado quando os elétrons são desviados da associação Fe-NO, ligando-se ao sítio de O₂ (PODEROSO *et al.*, 1996). Esse O₂⁻ dependente irá participar da redução do NO a OONO⁻, formará H₂O₂ e, ainda, estará envolvido junto ao OONO⁻, com a inativação da enzima aconitase. O H₂O₂ e o OONO⁻ aumentarão o estresse oxidativo resultando na modulação da respiração pelo baixo nível de NO (MIRANDA *et al.*, 2000).

A diminuição da concentração de NO celular afeta a atividade mitocondrial (BROOKES *et al.*, 2003) por causar desequilíbrio do balanço de NO/O₂. Existe uma competição entre ambos pelo centro de reação da enzima citocromo oxidase (BOVERIS *et al.*, 1999). Alta ou baixa concentração de NO no meio de capacitação diminuem a concentração de O₂ (BROOKES *et al.*, 2003) na mitocôndria, sugerindo uma menor produção de ATP pela cadeia respiratória (BROOKES *et al.*, 2003), podendo levar a uma alteração não apenas na motilidade e vigor, mas também em reações bioquímicas que resultem na diminuição do potencial fecundante do espermatozoide bovino.

Em condições fisiológicas, 1 a 3% dos elétrons envolvidos na cadeia de transporte de elétrons determina a formação de espécies reativas ao oxigênio (GUERIN *et al.*, 2001). Em concentrações reduzidas, as espécies reativas de

oxigênio mediam funções espermáticas normais, como capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozoide com oócito. Todavia, a produção elevada de espécie de oxigênio reativa (ROS), originada de disfunções mitocondriais (GILE e NOHL, 2001) induz ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, a modificações patofisiológicas nos espermatozoides (AITKEN, 1999). Esse fenômeno apresenta um ciclo deletério: as espécies reativas de oxigênio causam danos à membrana mitocondrial, que, em contrapartida, induzem ao aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (WANG *et al.*, 2002).

A produção excessiva de espécies de ROS por espermatozoides contendo gota citoplasmática no pós-descongelamento, podem induzir ao dano oxidativo que causa disfunções na célula espermática por meio de diversos mecanismos, como a peroxidação de lipídios na membrana plasmática, ocasionando a perda da fluidez e da capacidade de regular a concentração intracelular de íons, da motilidade e do metabolismo (GUERRA *et al.*, 2004).

A mitocôndria é responsável pela maior parte da produção endógena de ROS como biometabólitos, produzida pela cadeia respiratória (MAY-PANLOUP *et al.*, 2010), sendo considerada a reguladora central da apoptose celular (COPELAND, 2002) já que o aumento do cit C e outras proteínas pró-apoptóticas para o espaço intermembranas leva à ativação da caspase e à morte celular programada (GREEN e KROEMER, 2004). Em torno de 1 a 2% do O₂ molecular consumido durante a respiração fisiológica é convertido em radicais superóxidos (GOGVADZE *et al.*, 2004). Ao mesmo tempo, a mitocôndria possui um elaborado sistema de defesa para detoxicar os ROS e reparar os danos induzidos pelo ROS (GOGVADZE *et al.*, 2004).

3.12.3. Apoptose X Mitocôndria

Um dos marcadores da apoptose celular, conhecida como morte programada das células eucarióticas é a fragmentação do DNA genômico (DONNELLY *et al.*, 2000). A apoptose se diferencia da necrose, uma vez que, na primeira, a célula desempenha um papel caracterizado por modificações ultra-estruturais e bioquímicas, coordenadas por induções genéticas e moleculares, processo fundamental para sua própria destruição (WILLIAMS e SMITH, 1993).

A apoptose segue uma sequência de eventos que, de acordo com Kroemer *et al.* (1997), é classificada como

a diminuição do potencial de membrana mitocondrial procedido pela fragmentação do DNA nuclear, a produção de ROS e, finalmente, pelo aumento na permeabilidade da membrana. Uma das vantagens do uso de marcadores da integridade funcional das mitocôndrias para a mensuração da apoptose é que alterações nesse sistema podem ser detectadas em estágios que antecedem as lesões do DNA genômico (DONNELLY *et al.*, 2000).

Segundo Szeto (2006), o dano oxidativo mitocondrial tem demonstrado prejudicar a função mitocondrial levando à morte via apoptose e necrose. A redução do estresse oxidativo pode prevenir ou desacelerar a progressão de desordens degenerativas (SZETO, 2006). Entretanto, se a mitocôndria for a principal fonte de ROS intracelular e se elas são mais vulneráveis ao dano oxidativo, então, pode ser ideal uma terapia com antioxidante para a mitocôndria (SZETO, 2006).

3.12.4. Ácido desoxirribonucléico mitocondrial (DNAm_t)

O DNAm_t determina a hereditariedade citoplasmática, sendo uma molécula circular de dupla fita, com 16,5 kb, desprovida de histona (MAY-PANLOUP *et al.*, 2006). Ele apresenta 22 ácidos ribonucléicos transportadores (RNAt) e dois ácidos ribonucléicos ribossomais (RNAr) (ANDERSON *et al.*, 1981). Diferente do DNA nuclear, o DNAm_t não possui introns entre cada um dos genes (ST JOHN, 2002).

A taxa de mutações no DNAm_t é, aproximadamente, dez vezes maior do que no genoma nuclear (PARSONS *et al.*, 1997) devido às deleções causadas por estresse oxidativo, sob influência de ROS, assim como pela ausência ou mau funcionamento do mecanismo de recuperação do DNAm_t espermático (MEINHARDT *et al.*, 1999). A maior susceptibilidade a mutações embasa a hipótese de que a quantidade de DNAm_t no gameta masculino deve ser reduzida ao longo da espermatogênese, mantendo um número de cópias suficiente para as necessidades energéticas do espermatozoide, ao mesmo tempo em que previne a transmissão parental de moléculas de DNAm_t modificadas ou mutantes (KAO *et al.*, 2004).

A perda oxidativa do DNAm_t e da estrutura da membrana podem ser fatores de grande importância para explicar a diminuição da fertilidade e motilidade do sêmen criopreservado (CUMMINS *et al.*, 1994). Segundo Cavalcante *et al.* (2005), o número de espermatozoides caprinos, da raça Alpina, com quase todas as mitocôndrias com bainhas ativas no sêmen pós-coleta, foi maior (84,5%) comparado com sêmen

criopreservado (53,5%). No entanto, quando espermatozoides com a bainha mitocondrial fragmentada, com segmentos ativos e inativos foram analisados, o número de espermatozoides pós-coleta foi muito menor (0,5%) quando comparado com espermatozoides criopreservados (12%).

O DNAMt tem sido visto como essencial para estabilização e boa funcionalidade mitocondrial necessária para produzir a energia requerida para a motilidade espermática. Entretanto, no momento da fertilização, o DNAMt pode não ser mais útil e a transmissão para a progênie não ser desejável (MAY-PANLOUP *et al.*, 2010).

3.12.5. Avaliação da atividade mitocondrial

A habilidade para monitorar mudanças no potencial de membrana mitocondrial das células *in situ* pode ser crucial para avaliar mudanças fisiológicas da célula em várias situações experimentais (CELEGHINI *et al.*, 2007). O componente mais sensível ao potencial de membrana mitocondrial são as rodaminas e as carboxinas (REERS *et al.*, 1991). A atividade mitocondrial vem sendo avaliada por sondas fluorescentes e suas associações têm sido indicadas para permitir a avaliação simultânea de vários compartimentos da célula espermática (EVENSON *et al.*, 1982; GRAHAM *et al.*, 1990; NAGY *et al.*, 2004). Entretanto, é necessário identificar a melhor associação de sondas, pois algumas associações podem levar a resultados irregulares, mudando suas características e suas formas de fluorescência (CELEGHINI *et al.*, 2007).

A eficácia de várias sondas para monitorar o potencial de membrana plasmática é, usualmente, estabelecida utilizando inibidores da cadeia transportadora de elétrons da via de fosforilação oxidativa e de ionóforos (AMARAL e RAMALHO-SANTOS, 2009). Em qualquer desses casos, o potencial de membrana mitocondrial é interrompido e a produção de ATP pela mitocôndria é diminuída (AMARAL e RAMALHO-SANTOS, 2009).

3.12.5.1. Rodamina 123 (R123)

É um corante fluorescente que marca seletivamente o interior de células vivas, corando-as em verde apenas quando o gradiente de próton, sobre a membrana

mitocondrial interna, for construído (R123 é um corante potenciométrico de membrana) (GARNER *et al.*, 1997). Esse gradiente de próton é resultado da cadeia transportadora de elétrons ativa e é acoplado à fosforilação oxidativa: o próton flui de volta para a matriz mitocondrial, através da ATP sintase, conduzindo a produção de ATP aeróbico (GARNER *et al.*, 1997). A mitocôndria limpa do gradiente de próton entra em colapso e, conseqüentemente, a produção de ATP aeróbico é cessada (GARNER *et al.*, 1997). Logo, esses espermatozoides não conterão atividade mitocondrial.

Notadamente, um espermatozoide individual ou tem a peça intermediária totalmente fluorescente ou não fluoresce, indicando que a despolarização da membrana mitocondrial interna é um evento orquestrado, ocorrendo imediatamente sobre toda a peça intermediária (MUKAI e OKUNO, 2004). De acordo com Graham *et al.* (1990), a R123 é retida mais intensivamente na mitocôndria funcional e deprimida por inibidores mitocondriais, indicando que o R123 pode detectar o dano mitocondrial.

3.12.5.2. Mitotracker

Os Mitotracker Deep Red TM, Mitotracker Red TM, Mitotracker Orange TM e Mitotracker Green TM também são marcadores seletivos da respiração mitocondrial e podem ser usados para avaliar múltiplos parâmetros espermáticos (GADELLA e HARRISON, 2002). Mitotracker orange CM-H₂TMROS e Mitotracker X-Rosamine CM-H₂XROS começam a fluorescer após a oxidação, um processo que apenas ocorre durante respiração oxidativa (de VRIES, 2003), uma vez que este processo só é relevante na mitocôndria funcional. Estas sondas são adequadas para discriminar espermatozoides com mitocôndrias deterioradas a partir da capacidade aeróbica dessa célula (GADELLA e HARRISON, 2002; de VRIES, 2003).

Recentes desenvolvimentos têm resultado em novas aplicações para os chamados corantes Mitotrackers (SILVA e GADELLA, 2006): 1) Após a coloração do espermatozoide, a suspensão pode ser fixada e permanecer corada especificamente na mitocôndria (SUTOVSKY *et al.*, 2003). 2) Alguns corantes Mitotrackers e o JC1 podem mudar suas propriedades fluorescentes, devido a mudanças no potencial da membrana mitocondrial interna (GARNER e THOMAS, 1999): alguns corantes Mitotrackers só fluorescem quando intercalados em gradientes de membrana

mitocondrial interna; outros apenas fluorescem após interagir com radicais que os convertem para fluorescência (SILVA e GADELLA, 2006).

Uma vez que as mitocôndrias perdem a sua integridade, o gradiente de próton da membrana é perdido e, com isso, não há produção de ATP (SILVA e GADELLA, 2006). Além disso, o cit C (um dos componentes da cadeia transportadora de elétrons) é perdido e se difunde para fora da célula (SILVA e GADELLA, 2006). Como consequência, a respiração é bloqueada e os corantes Mitotracker não são sensíveis ao potencial de membrana mitocondrial interno (SILVA e GADELLA, 2006). Os Mitotracker são sondas não fluorescentes em solução aquosa, mas começam a fluorescer quando acumulam lipídio na mitocôndria (HAU-GLAND, 2001). Essas sondas têm sido utilizadas em espermatozoides humanos para visualizar displasia da bainha (RAWE *et al.*, 2001) e em espermatozoide bovino para verificar efeito da criopreservação (GARNER *et al.*, 1997).

Uma maneira alternativa de detectar a produção adequada de ATP é observar as características adequadas de motilidade espermática pelo analisador de motilidade espermática assistida computadorizada (CASA) (AMANN e KATZ, 2004)

3.12.5.3. JC1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina)

A sonda JC1 tem sido utilizada como um método sensível para detectar mais precisamente mudanças no potencial de membrana mitocondrial de várias espécies animais (GARNER *et al.*, 1997). Esta é a única probe com propriedades de discriminar alto ou baixo potencial de membrana mitocondrial (GRAVANCE *et al.*, 2000). A sonda separa duas populações por código de cor (figura 15), mostrando mitocôndrias com alto potencial de membrana em vermelho e marcando em verde aquelas com baixo potencial (GARNER *et al.*, 1997; CELEGHINI *et al.*, 2007), momento em que ocorre a despolarização da membrana mitocondrial interna (GARNER e THOMAS, 1999). Logo, o JC1 pode ser usado para detectar a despolarização da membrana mitocondrial interna e, com isso, avaliar a funcionalidade da mitocôndria (SILVA e GADELLA, 2006).

O JC1 possui habilidade para formar multímeros conhecidos como J-agregados após a acumulação na mitocôndria com alto potencial de membrana (GRAVANCE *et*

al., 2000). Além de formar J-agregados, o JC1 pode formar monômeros (banda M) na mitocôndria com baixo potencial de membrana (GARNER *et al.*, 1997).

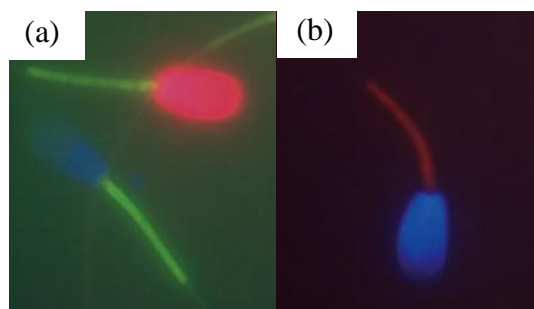


Figura 15- Espermátóides corados com JC1, IP e hoechst: (a) peça intermediária corada em verde, demonstrando baixo potencial mitocondrial; (b) peça intermediária corada em vermelho, demonstrando alto potencial mitocondrial (CELEGHINI *et al.*, 2007).

O uso da sonda JC1 é mais vantajoso do que as rodaminas e carbocianinas, pois ela é capaz de se ligar seletivamente à mitocôndria e as mudanças de coloração são reversíveis, do verde ao alaranjado, de acordo com o aumento do potencial de membrana acima de valores de 80 a 100 mV (COSSARIZZA *et al.*, 1993). Esta propriedade é reversível devido à formação de J-agregados na membrana polarizada, que causam a mudança da emissão de luz de 530nm (emissão das formas monoméricas de JC1) para 590nm (emissão de J-agregados), quando excitados a 490nm (COSSARIZZA *et al.*, 1993). Assim, quando a coloração passa de verde para laranja, a membrana mitocondrial está mais polarizada (COSSARIZZA *et al.*, 1993; GRAVANCE *et al.*, 2000; COSSARIZA, 2007). Troiano *et al.* (1998) observaram correlação significativa entre potencial mitocondrial e motilidade, assim como entre potencial mitocondrial e degeneração da cromatina.

3.13. Fertilização *in vitro* (FIV)

Fertilização é a capacidade do espermatozoide fertilizar o oócito, seja *in vitro* ou *in vivo*. Para que isso ocorra, é necessária uma adequada maturação oócitaria assim como uma capacitação espermática bem sucedida que permita a reação acrossômica para que o espermatozoide consiga penetrar a zona pelúcida e se fundir à membrana plasmática do oócito (MENDES *et al.*, 2003). No entanto, um dos

grandes desafios do sistema de cultivo de embriões é a perfeita condição de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro*, em função da complexidade dos vários ambientes por que os gametas e embriões passam durante o desenvolvimento *in vivo* (MEIRELLES *et al.*, 2004).

Segundo Breininger *et al.* (2010), o meio de FIV contendo 10 IU/mL de heparina proporcionou maiores taxas de clivagem quando comparado com o controle e o meio contendo bicarbonato (30 mM), cafeína (7,5 mM) ou adenosina (10 μ M). Já a adição do anion superóxido (0,05 mM xantina + 5 IU/mL xantina oxidase + 100 μ g/mL catalase) diminui as taxas de clivagem. A associação do bicarbonato (30 mM) com cafeína (7,5 mM), no meio de FIV, aumentou a taxa de clivagem quando comparado com o controle, não diferindo da heparina. Essa melhora foi explicada pela ativação da adenilato ciclase solúvel pelo bicarbonato e aumento da AMPc, considerando que a cafeína reprime a hidrólise do AMPc e aumenta o cálcio intracelular, estimulando com isso a hipermotilidade.

Rosenkranz e Holzmann (1997) descreveram que os espermatozoides selecionados por transmigração (capacidade dos espermatozoides atravessarem uma membrana com poros de 8 μ m para alcançar o meio de maturação) obtiveram maior sucesso comparado com os selecionados por *swim-up* na fertilização, alcançando após 7 h de cultivo 84,8% e 4,2% de oócitos penetrados, respectivamente. No entanto, após 3 h de cultivo, já é possível observar oócitos penetrados e, segundo Saeki *et al.* (1991) e Xu e Greve (1988), a incidência de polispermia na FIV, utilizando espermatozoides criopreservados, aumenta com o aumento das horas de cultivo. Já em outros estudos (ROSENKRANZ *et al.*, 1994; ROSENKRANZ e HOLZMANN, 1995), o aumento da porcentagem de oócitos com poliespermia demonstrou ser consequência do tratamento dos espermatozoides com *swim-up*, visto que, quando tratados com transmigração, essa porcentagem foi muito menor.

Apesar dos grandes avanços, embriões produzidos *in vitro* ainda são conhecidos pela baixa qualidade, quando comparado com embriões produzidos *in vivo* (KEPKOVA *et al.*, 2011). Vários grupos de pesquisa vêm tentando aprimorar os meios de cultivo usados na maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário visando o aumento da produção e qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (BERMEJO-ALVAREZ *et al.*, 2010; SAADELDIN *et al.*, 2011).

Nesse sentido, estudos recentes têm voltado um pouco mais a atenção para o processo de capacitação espermática. Vários estudos, por exemplo, vêm pesquisando o papel benéfico da L-arginina na capacitação e reação acrossômica em algumas espécies de mamíferos como em suínos (FUNAHASHI, 2002), bubalinos (ROY e ATREJA, 2008) e bovinos (O' FLAHERTY *et al.*, 2004; SILVA, 2009; LEAL *et al.*, 2009). A L-arginina é a precursora para produção de NO e este, por sua vez, é um potente sinalizador celular que está envolvido na ativação de proteínas cinases que coordenam a sequência de eventos que culminam na reação acrossômica (RODRIGUEZ *et al.*, 2005).

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A., MAKKER, K., SHARMA, R. (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *J. Reprod. Immun.* 59: 2-11.
- AISEN, E., QUINTANA, M., MEDINA, V., MORELLO, H., VENTURINO, A. (2005) Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose – based hypertonic extenders. *Cryobiology* 50: 239-249.
- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D., HARKISS, D. (1993) Use of a xanthine oxidase free radical generation system to investigate the cytotoxic effect of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 97: 441-450.
- AITKEN, R.J. (1995) Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 659-668.
- AITKEN, R.J. (1999) The human spermatozoa: a cell in crisis? *J. Reprod. Fertil.* 115: 1-7.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (2004) Estrutura da membrana In: *Biologia molecular da célula* 4: 583-615 Artmed.
- ALVAREZ, J.G., TOUCHSTONE, J.C., BLASCO, L., STOREY, B.T. (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl.* 8: 338–348.
- AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. (1993) Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger p.715-745.
- AMANN, R.P., KATZ, D.F. (2004) Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.* 25: 317-325.

- AMARAL, A., RAMALHO-SANTOS, J. (2009) Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct monitoring of human sperm function. *J. Androl.* doi: 10.1111/j.1365-2605.2009.00987.x
- ANDERSON, S., BANKIER, A.T., BARRELL, B.G., DE BRUIJN, M.H., COULSON, A.R., DROUIN, J., EPERON, I.C., NIERLICH, D.P., ROE, B.A., SANGER, F., SCHREIER, P.H., SMITH, A.J., STADEN, R., YOUNG, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- ANKRI, R., FRIEDMAN, H., SAVION, N., KOTEV-EMETH, S., BREITBART, H., LUBART, R. (2010) Visible light induces nitric oxide (NO) formation in sperm and endothelial cells. *Lasers Sur. Med.* 42: 348-352.
- ARMSTRONG, J.S., RAJASEKARAN, M., CHAMULITRAT, W., GATTI, P., HELLSTROM, W.J., SIKKA, S.C. (1999) Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 869-880.
- ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., GAJEWSKI, E., DIZDAROGLU, M. (1989) Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J Biol Chem.* 20: 509-12.
- AUSTIN, C.R. (1951) Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.* B4: 581-596.
- BALDI, E., CASANA, R., FALSETTI, C., KRAUSZ, C., MAGGI, M., FORTI, G. (1991) Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl.* 12: 323-330.
- BALERCIA, G., MORETTI, S., VIGINI, A., MAGAGNINI, M., MANTERO, F., BOSCARO, M., RICCIARDO-LAMONICA, G., MAZZANTI, L. (2004) Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. *J. Androl.* 25: 245-249.

- BANAN, A., FIELDS, J.Z., ZHANG, Y., KESHAVARZIAN, A. (2001) iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 280: 1234-1246.
- BANSAL, A.K., BILASPURI, G.S. (2007) Effect of ferrous ascorbate on in vitro capacitation and acrossome reaction in cattle bull spermatozoa. *Anim. Sci. Report.* 1: 69-77.
- BARBINI, B., MATIOLLI, M., SEREN, E. (1995) Influence of progesterone on boar sperm capacitation. *J. Endocrinol.* 144: 13-18.
- BARBOSA, R.T., ESPER, C.R. (1997) Avaliação e demonstração da atividade da citocromo c oxidase em espermatozoides bovinos. *Ars Vet. Jaboticabal*, n.3, v.13, p.218-223.
- BARTH, A.D., OKO, R.J. (1989) Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Estados Unidos: Iowa University Press 285-285.
- BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B.A. (2003) Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology* 60: 1239-1247.
- BEEHLER, C.J., SIMCHUK, M.L., TOTH, K.M. (1989) Blood sulfhydryl level increases during hyperoxia: a marker of oxidant lung injury. *J. Appl. Physiol.* 67: 1.070-1075.
- BEORLEGUI, N., CETICA, P., TRINCHERO, G., CÓRDOBA, M., BECONI, M. (1997) Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. *Andrologia* 29: 37-42.
- BERGERON, A., MANJUNATH, P. (2006) New insights towards understanding the mechanism of sperm protection by eggs yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 1338-1344.

- BERMEJO-ALVAREZ, P., LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIÉRRES-ADAM, A. (2010) Low oxygens tensions during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reprod. Biomed. Online* 3:341-349.
- BILODEAU, J.F., BLANCHETTE,S., GAGNON, C., SIRARD, M.A. (2001) Thiols prevent H₂O₂ – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56: 275-288.
- BILODEAU, J.F., BLANCHETTE, S., CORMIER, N., SIRAD, M-A. (2002) Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 57: 1105-1122.
- BOATMAN, D.E. e ROBBINS, R.S. (1991) Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol. Reprod.* 44: 806-813.
- BORUTAITE, V., BROWN, G.C. (1996) Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Biochem. J.* 315: 295-299.
- BOVERIS, A.A., COSTA, L., CADENAS, E., PODEROSO, J.J. (1999) Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide. *Methods Enzymol.* 301: 188-198.
- BREDT, D.S., GLATT, C.E., HWANG, P.M., FOTUHI, M., DAWSON, T.M., SNYDER, S.H. (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuronal* 7: 615-624.
- BREININGER, E., CETICA, P.D., BECONI, M.T. (2010) Capacitation inducers act through intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. *Theriogenology* 74: 1036-1049.

- BROOKES, P.S., KRAUS, D.W., SHIVA, S., DOELLER, J.E., BARONE, M.C., PATEL, R.P., LANCASTER, J.R., DARLEY-USMAR, V. (2003) Control of mitochondrial respiration by NO, effects of low oxygen and respiratory state. *J. Biol. Chem.* 278: 31603-31609.
- BROUWERS, J.F., SILVA, P.F.N., GADELLA, B.M. (2005) New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology* 63: 458-469.
- BUCAK, M.N., SARIOZKAN, S., TUNCER, P.B. (2010) The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, 89: 24-30.
- BUHR, M.M., CURTIS, E.F., KAKUDA, N.S. (1994) Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31: 224-238.
- CARREIRA, J.T. (2008) Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, potencial mitocondrial, cromatina e produção de embriões *in vitro* de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal. Dissertação UNESP – Jaboticabal – SP – Brasil.
- CASSINA, A., RADI, R. (1996) Differential inhibitory action of oxide nitric and peroxyxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 328: 309-316.
- CASTELLINI, C., CARDINALI, R., DAL BOSCO, A., MINELLI, A., CAMICI, O. (2006) Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology* 65: 703-712.
- CAVALCANTE, T.V., ESPER, C.R., FERREIRA, J.L., DIAS, F.E.F., AZEVEDO, H.C., CORDEIRO, M.F., SOUZA, J.A.T. (2005) Avaliação da atividade mitocondrial em espermatozoides pós-colheita e pós-descongelamento de caprinos das raças Bôer e Alpina no outono e primavera. *Arch. Vet. Sci.* 10: 89-93.

- CELEGHINI, E.C.C., DE ARRUDA, R.P., DE ANDRADE, A.F.C., NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C.F. (2007) Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. *Reprod. Dom. Anim.* 42: 479–488.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. (2000) Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 99-111.
- CHAMBERLAND, A., FOURNIER, V., TARDIF, S., SIRARD, M.A., SULLRVAN, R., BARLEY, J.L. (2001) The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* 55: 823-835.
- CHANG, M.C. (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698.
- CLARKE, R.N., KLOCK, S.C., GEOGHEGAN, A. (1999) Relationship between psychological stress and semen quality among *in vitro* fertilization patients. *Hum. Reprod.* 14: 753-758.
- CLARKSON, R.B., NORBY, S.W., SMIRNOV, A., VAHDI, N., BOYER, S., NIMS, R.W., WINK, D.A. (1995) Direct measurement of the accumulation and mitochondrial conversion of nitric oxide within Chinese hamster ovary cells using an intracellular electron paramagnetic resonance technique. *Biochem. Biophys. Arch.* 1243: 496-502.
- CLELIA, E. e FENICHEL, P. (1997) Protein tyrosine phosphorylation is associated with capacitation of human sperm *in vitro* but is not sufficient for its completion. *Biol. Reprod.* 56: 674-679.
- CLEETER, M.W.J., COOPER, J.M., DARLEY-USMAR, V.M., MONCADA, S., SCHAPIRA, A.H. (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345: 50-54.

- COHEN-DAIAG, A., TUR-KASPA, I., DOR, J., MASHIACH, S., EISENBACH, M. (1995) Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 11039-11043.
- COHN, V. H., LYLE, J., (1966) A fluorometric assay for glutathione. *Anal. Biochem.* 14: 434-440.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (1998) Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2ª ed, Belo Horizonte, 49p.
- COMPAGNONE, D.; MASSOUD, R.; DI ILIO, C.; FEDERICI, G. (1991) Potentiometric Determination of Glutathione and Glutathione Transferase Activity. *Anal. Lett.* 24: 993-1004.
- COPELAND, W.C. (2002) Mitochondrial DNA: methods and protocols. Totowa, NJ: Hum. Press, p.420.
- COSSARIZZA, A., BACCARANI-CONTRI, M., KALASHNIKOVA, G., FRANCESCHI, C. (1993) A new method for cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC1). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 197: 40-45.
- COSSARIZZA, A. (2007) Measure of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) with fluorescent probe JC1. CD-ROM Series, vol.3, Purdue University Cytometry Laboratories Website. <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/flow/vol3/16/data/page13.htm>
- CROSS, N.L. (1998) Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* 59: 7-11
- CUMMINS, J.M., JEQUIER, A.M., KAN, R. (1994) Molecular biology of the human male infertility: links with ageing, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Mol. Reprod. Dev.* 37: 345-362.

- das GUPTA, S., O'TOOELE, C., MILLS, C.L., FRAZER, L.R. (1994) Effect of pentoxifylline and progesterone on human sperm capacitation and acrosomal exocytose. *Hum. Reprod.* 9: 2103-2109.
- de LAMIRANDE, E., LECLERC, P., GAGNON, C. (1997) Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.*, 3: 175- 193.
- de LAMIRANDE, E., HARAKAT, A., GAGNON, C. (1998) Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. *J. Androl.* 19: 215-225.
- DENEKE, S.M., FANBURG, B.L. (1989) Regulation of cellular glutathione. *Am. J Physiol.* 257: 163-73.
- DESAI, N.R., SHARMA, R., MARKER, K., SABNEGH, E., AGARWAL, A. (2009) Physiological and pathological levels of reactive oxygen species in neat semen of infertility men. *Fertil. Steril.* 92: 1626-1631.
- DESAI, N.R., MAHFOUZ, R., SHARMA, R., GUPTA, S., AGARWAL, A. (2010) Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study. *Fertil. Steril.* 94: 1541-1543.
- de VRIES, K.J., WIEDMER, T., SIMS, P.J., GAZELLA, B.M. (2003) Caspatase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol. Reprod.* 68: 2122-2134.
- DIXIT, V.D., PARVIZI, N. (2001) Nitric oxid and the control of reproduction. *Anim. Reprod Sci.* 65: 1-6.
- DONNELLY, E.T., LEWIS, S.E.M., THOMPSON, W., CHAKRAVARTHY, U. (1997) Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. *Mol. Hum. Reprod.* 3: 755-762.

- DONNELLY, E.T., O'CONNELL, M., MCCLURE, N., LEWIS, S.E. (2000) Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 15: 1552-1561.
- DRUMMEN, G.P., GADELLA, B.M, POST, J.A., BROUWERS, J.F. (2004) Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY (581/591). *Free Radic. Biol. Med.* 36: 1635–1644.
- DURU, N.K., MORSHEDI, M., OEHNINGER, S. (2000) Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 74, 1200-1207.
- EDDY, E.M. (1988) The spermatozoa. In: KNOBIL, E., NEIL, J.D. *Physiol. Reprod.* New York: Raven Press, 27-68.
- ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. (1999) Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. *Andrologia* 31: 17-22.
- ESKIOCAK, S., GOZEN, A.S., TASKIRAN, A., KILIC, A.S., ESKIOCAK M., GULEN S. (2006) Effect of psychological stress on the L-arginine-nitric oxide pathway and semen quality. *Braz. Jour. Med. Biol. Res.* 39: 581-588.
- EVERSON, D.P., DARZYNKIEWICZ, Z., MELAMED, M.R. (1982) Simultaneous measurements by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.* 30: 279-280.
- FERREIRA-BERBARI, J.B.P; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C; PAES DE CARVALHO, C.S; KNACKFUSS, F.B. (2007) Efeito da adição de diferentes concentrações de ácido retinóico na motilidade e integridade de membrana de espermatozoides bovinos capacitados *in vitro*. *Acta Scie Vet* 35 (supl 03) p. 1091.
- FERREIRA-BERBARI, J.B.P (2008) Efeito das enzimas óxido nítrico sintase induzível na capacitação *in vitro* induzida pela heparina de espermatozoides bovinos *in natura*. *JBCA* v1, n2.

FERREIRA-BERBARI, J.B.P; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C; PAES DE CARVALHO, C.S., VIANA, K.S., LEAL, A.C.M.S; QUIRINO, C.R. (2010) Efeito da inibição da óxido nítrico sintase induzível na capacitação de espermatozoides bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62: 511-520.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil.* 43: 61-8.

FLESCH, F.M., GADELLA, B.M. (2000) Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochem. Biophys. Acta.* 1469: 197-235.

FLOYD, R.A. (1990) Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4: 587-97.

FORESTA, C., ROSSATO, M., MIONI, R., ZORZI, M. (1992) Progesterone induces capacitation in human spermatozoa. *Andrology* 24: 33-35.

FORSTERMANN, U., GATH, I., SCHWARZ, P., GLOSS, E.I., KLEINERT, H. (1995) Isoforms of nitric oxide syntase: Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem. Pharmacol.* 50: 1321-1332.

FRANCAVILLA, F., SANTUCCI, R., MACEROLA, B., RUVOLO, G., ROMANO, R. (2000) Nitric Oxide syntase inhibition in human sperm affects sperm affects sperm-oocyte fusion but not zona pellucida binding. *Biol. Reprod.* 63: 425-429.

FRASER, L.R. (1995) Ionic control of sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 905-925.

FRISCHER, H., AHMAD, T. (1987) Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency. *J Lab. Clin. Med.* 109: 583-588.

FUNAHASHI, H. (2002) Induction of capacitation and the acrosome reaction of boar spermatozoa by L-arginine and nitric oxide synthesis associated with the anion transport system. *Reproduction* 124: 857-864.

- GADELLA, B.M., LOPES-CARDOZO, M., VAN GOLDE, L.M., COLENBRANDER, B., GADELLA JR, T.W. (1995) Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. Evidence for a primary capacitation event in boar spermatozoa. *J. Cell. Sci.* 108: 935–946.
- GADELLA, B.M., HARRISON, R.A. (2002) Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol. Reprod.* 67: 340-350.
- GALANTINO-HOMER, H.L., VISCINTI, P.E., KOPF, G.S. (1997) Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3', 5'- monophosphate- dependent pathway. *Biol. Reprod.* 56: 707-719.
- GALLEANO, M., PUNTARULO, S. (1995) Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim Biophys Acta*; 1271(2-3), 321-326.
- GARCÍA-HERREROS, M., APARICIO, I.M., NÚÑEZ, I., GARCÍA-MARÍN, L.J., GIL, M.C., PEÑA VEGA, F.J. (2005) Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. *Theriogenology* 63: 795-805.
- GARDÈS-ALBERT, M., Jore, D., Ferradini, C. (1991) Membrane lipid peroxidation: pulse and radiolysis in oxyradical research. In Vigo- Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Santa Clara, CRC Press, 2-30.
- GARNER, D.L., THOMAS, C.A., JOERG, H.W., DEJARNETTE, J.M., MARSHALL, C.E. (1997) Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57: 1401-1406.

- GARNER, D.L., THOMAS, C.A. (1999) Organelle-specific probe JC1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 222-229.
- GARRIDO, N., MESEGUER, M., SIMON, C. (2004) Peroxidative and antioxidative imbalance in human sêmen and its relation with male infertility. *Asian J. Androl.* 6: 59-65.
- GARTHWAITE, J., SOUTHAM, E., BOULTON, C.L., NIELSEN, E., SCHMIDT, K., MAYER, B., (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1-H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharm.* 48: 184-188.
- GATH, I., CLOSS EI, GODTEL-ARMBRUST U, SCHMITT S, NAKANE M, WESSLER I, FORSTERMANN U. (1996) Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: implications for contractile function. *FASEB J.* 10: 1614–1620.
- GHAFORIFAR, P., RICHTER, C. (1997) Nitric oxide syntase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 418: 291-296.
- GILBERT, H.F., MC LEAN, V.M. (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol. Biol.* 63: 69-172.
- GILLE, L., NOHL, H. (2001) The ubiquinol/bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation. *Arch Biochem Biophys* 338: 34-38.
- GIRAUD, M.N., MOTTA, C., BOUCHER, D., GRIZARD, G. (2000) Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 15: 21160-2164.
- GIULIVE, C., PODEROSO, J.J., BOVERIS, A. (1998) Production of nitric oxide by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273: 11038-11043.

- GOGVADZE, V., ROBERTSON, J.D., ENOKSSON, M., ZHIVOTOVSKY, B., ORRENIUS, S. (2004) Mitochondrial cytochrome c release may occur by volume-dependent mechanisms not involving permeability transition. *Bioch. J.* 378: 213-217.
- GONÇALVES, F., BARRETO, L.S.S., ARRUDA, R.P., PERRI, S.H.V., MINGOTI, G.Z. (2010) Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization products on spermatozoa and embryo development. *Reprod. Dom. Anim.* 45: 129-135.
- GRAHAM, J.K., KUNZE, E., HAMMERSTEDT, R.H. (1990) Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.* 43, 55-64.
- GRAVANCE, C.V., GARNER, D.L., BAUMBER, J., BALL, B.A. (2000) Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC1. *Theriogenology* 53: 1691-1703.
- GREEN, D.R. e KROEMER, G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626-629.
- GUERIN, P.F., MOUATASSIM, S., MENEZO, Y. (2001) Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pré-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update* 7: 175-189.
- GUERRA, M.M.P., EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. (2004) Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 28: 187-195.
- GUILBAULT, G. G., BRIGNAC Jr., P., ZIMMER, M. (1968) Homovanillic acid as a fluorometric substrate for oxidative enzymes. Analytical applications of the peroxidase, glucose oxidase, and xanthine oxidase systems. *Anal. Chem.* 40: 190.
- GUNDOGAN, M., YENI, D., AVDATEK, F., FINDAN, A.F. (2010) Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along

- with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 122: 200-207.
- GUTHRIE, H.D., WELCH, G.R. (2006) Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J. Anim. Sci.* 84: 2089-2100.
- GUTHRIE, H.D., WELCH, G.R. (2007) Use fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of viable boar sperm loaded with 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid. *J. Anim. Sci.* 85: 1402-1411.
- GUZMAN-GRENFELL, A. M. (1999) Effect of nitric oxide releasers on some metabolic processes of rabbit spermatozoa. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 42: 19-123.
- HALBERT, K. H., BALDWIN, R. P. (1985) Determination of cysteine and glutathione in plasma and blood by liquid chromatography with electrochemical detection using a chemically modified electrode containing cobalt phthalocyanine. *J. Chromatogr.* 345: 43-49.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85.
- HAYES, C., BUDNICK, R. M., GANTHER, H. E. (1991) Chemical form of selenium, critical metabolites, and cancer prevention. *Cancer Res.* 51, 595.
- HARRISON, R.F., O'MOORE, R.R., O'MOORE, A.M. (1986) Stress and fertility: some modalities of investigation and treatment in couples with unexplained infertility in Dublin. *Internat. J. Fertil.* 31: 153-159.

- HARRISON, R.A.P. (1996) Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 581-594.
- HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. (1990) Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88: 343-352.
- HARRISON, R.A., GADELLA, B.M. (2005) Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63: 342-351.
- HAUGLAND, R.P. Assay for cell viability, proliferation and function. In: Handbook of fluorescent probs and research products 9 th ed., Eugene: Molecular Probes Inc., 2004, chapter 15.
- HEATH R. L., TAPPEL, A. L. (1976) A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides. *Anal. Biochem.* 76: 184-191.
- HEBBEL, R.P. (1986) Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J. Lab. Clin. Med.* 107: 401-404.
- HELLSTRON, W.J.G., BELL, M., WANG, R., SIKKA, S.C. (1994) Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. *Fertil. Steril.* 61: 117-1122.
- HERRERO, M.B., CEBRAL, E., BOQUET, M., VIGGIANO, J.M., VITULLO, A., GIMENO, M.A.F. (1994) Effect of nitric oxide on mouse sperm hyperactivation. *Apptla* 44: 65-69.
- HERRERO, M.B., PEREZ-MARTINEZ, S., VIGGIANO, J.M., POLAK., GIMENO, M.F. (1996) Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide syntase in mouse and human spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 931-934.
- HERRERO, M.B., VIGGIANO, J.M., PEREZ MARTINEZ, S., GIMENO, M.F. (1997) Evidence that nitric oxide syntase is involved in progesterone-induced acrossomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 9: 433-439.

- HERRERO, M.B., CHATTERJEE, S., LEFRIEVE, L., de LAMIRANDE, E., GAGNON, C. (2000) Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Rad. Biol. Med.* 29: 522-536.
- HIBBS, J.B., JR., VAVRIN, Z., TAINTOR, R.R. (1987) L-arginine is required for the expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* 138: 550-565.
- HO, H-C., GRANISH, K.A., SUAREZ, S.S. (2002) Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev. Biol.* 250: 208-217.
- HUNTER, R.H.F., HALL, J.F. (1974) Capacitation of boar spermatozoa: Synergism between uterine and tubal environments. *J. Exp. Zool.* 188: 203-210.
- IGNARRO, L.J. (2000) Introduction and Overview. In: Ignarro, L.J. (ed.) *Nitric oxide. Biol. Pathobiol.* San Diego: Academic Press, p. 12-17.
- JAGAN MOHANARAO, G., ATREJA, S.K. (2011) Identification of NO induced and capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Res. Vet. Sci* doi: 10.1016/j.rvsc.2011.09.017.
- JAISWAL, B.S., COHEN-DAYAG, A., TUR-KASPA, I., EISENBACH, M. (1998) Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS Letters* 427: 309-313.
- JAMES, P.S., WOLFE, C.A., MACKIE, A., LADHA, S., PRENTICE, A., JONES, R. (1999) Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 14: 1827-1832.
- JANUSKAUSKAS, A., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2003) Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 60: 743-758.

- JENTZSCH, A.M., BACHMANN, H., FÜRST, P., BIESALSKI, H.K. (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Rad Biol Med* 20: 251-256.
- JÚNIOR, L.R., HÖEHR, N.F., VELLASCO, A.P. (2001) Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova* 24: 112-119.
- KAO, S.H., CHAO, H.T., LIU, H.W., LIAO, T.L., WEI, Y.H. (2004) Sperm mitochondrial DNA depletion in man with asthenospermia. *Fertil. Steril.* 82: 66-73.
- KASIMANICKAM, R., PELZER, K.D., KASIMANICKAM, V., SWECKER, W.S., THATCHER, C.D. (2006) Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology* 65: 1407-1421.
- KEFER, J.C., AGARWAL, A., SABANEH, E. (2009) Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int. J. Urol.* 16: 449-457.
- KEPKOVA, K.V., VODICKA, P., TORALOVA, T., LOPATAROVA, M., CECH, S., DOLEZEL, R., HAVLICEK, V., BESENFELDER, U., KUSMANY, A., SIRARD, M.A., LAURINCIK, J., KANKA, J. (2011) Transcriptomic analysis of *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos revealed a developmental change in cullin 1 expression during maternal-to-embryonic transition. *Theriogenology* 75: 1582-1595.
- KILEY, P.J., STORZ, G. (2004) Exploiting thiol modifications. *PLoS Biology*, 2, 1714-1717.
- KLEIN, C (2001) Nitric oxide and the other cyclic nucleotide. *Cell. Sign.* 14: 493-498.
- KODAMA, H., KURIBAYASHI, Y., GAGNON, C. (1996) Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J. Androl.* 17: 151-157.

- KOMMISRUD, E., PAULEN, H., SEHESTED, F., GREVLE, I.S. (2002) Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet. Scand.* 43: 49-55.
- KOPF, G.S. e GERTON, G.L. (1991) The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction. In: Wassarman, PM (ed). *Elements of Mammalian Fertilization*. Boca Ratan, FL, CRC Press, 153-203.
- KROEMER, G., ZAMZAMI, N., SUSIN, S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* 18: 44-51.
- KRZYZOSIAK, J., EVENSON, D., PITT,C., JOST, L., MOLAN, P., VISHWANATH, R. (2000) Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. *Reprod. Fertil. Devel.* 12: 251-261.
- LADHA, S. (1998) Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J. Memb. Biol.* 165: 1-10.
- LAMPIAO, F., STRIJDOM, H., PLESSIS, S. S. (2006) Direct nitric oxide measurement in human spermatozoa: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *Int. J. Androl.* 29: 564-567.
- LAFFRANCHI, R., GOGVADZE, V., RITHER, C., SPINAS, G.A. (1995) Nitric oxide (nitrogen monoxide, NO) stimulates insulin secretion by inducing calcium release from mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217: 584-591.
- LANCASTER, J.R., JR., HIBBS, J.B., JR. (1990) EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1223-1227.
- LAPENNA, D., CIOFANI, G., PIERDOMENICO, S.D., GIAMBERARDINO, M.A., CUCCURULLO, F. (2001) Reaction condicions affecting the relationship between

thiobarbituric acid reactivity and lipid preoxides in human plasma. *Free Rad. Biol Med.* 31: 331-335.

LAPOINTE, S.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M-A. (1998) Binding of a bovine oviductual fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.* 58: 747-753.

LEAL, A.C.M.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C.; PAES DE CARVALHO, C. S., VIANA, K. S., QUIRINO, C. S. (2009) Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced *in vitro* capacitation. *Anim. Reprod. Sci.* 116: 38-49.

LECLERC, P., SIRARD, M.A., CHAFOULEAS, J.G., LAMBERT, R.D. (1992) Decrease in calmodulin concentrations during heparin-induced capacitation in bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 94: 23-32.

LEWIS, S.E.M., DONNELLY, E.T., STERLING, E.S.L., KENNEDY, M.S., THOMPSON, W., CHAKRAVARTHY, U. (1996) Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol. Hum. Reprod.* 2: 873-878.

LIZASOAIN, I., MORO, M.A., KNOWLES, R.G., DARLEY-USMAR, V., MONCADA, S. (1996) Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem. J.* 314: 877-880.

LÓPEZ-FIGUEROA, M.O., CAAMAÑO, C., MORANO, M.I., RONN, L.C, AKIL, H., WATSON, S.J. (2000) Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1: 129-133.

LOWENSTEIN, C.J., DINERMAN, J., SNYDER, S.H. (1994) Nitric oxide a physiologic messenger. *Ann. Int. Med.* 120: 227-237.

- LUKEFAHR, S.D., HOHENBOKEN, W. (1981) Characteristics of spermatozoa midpiece length and its relationship with economically important traits incattle. *J. Dairu Sci*, Champaign, 64: 508-512.
- MADAMANCHI, N.R., VENDROV, A., RUNGE, M.S. (2005) Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 25: 29-38.
- MAIA, M.S. (2006) Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), Trolox-C e catalase. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 164 p. Tese de Doutorado.
- MANSOOR, M. A., SVARDAL, A. M., UELAND, P. M., (1992) Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. *Anal. Biochem.* 200: 218-229.
- MARSHALL, P. J., WARSO, M.A., LANDS, W.E.M. (1985) Selective microdetermination of lipid hydroperoxides. *Anal. Biochem.* 145: 192-199.
- MAY-PANLOUP, P., CHRETIEN, M.F., MALTHIERY, Y., REYNIER, P. (2006) An mitochondrial du spermatozoide. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 34: 847-854.
- MAY-PANLOUP, P., MALTHIERY, Y., REYNIER, P. Mitochondria and Spermatozoa in: LEJEUNE, T., DELVAUX, P. (Ed). *Human spermatozoa*. New York: Nova Biomedical, 2010 p. 307-326
- MEINHARDT, A., WILHELM, B., SEITZ, J. (1999) Mini symposium: new aspects of spermatogenesis: expression of mitochondrial marker proteins during spermatogenesis. *Hum. Reprod. Update.* 5: 108-119.
- MEISER, H., SCHULZ, R. (2003) Detection and localization of two constitutive NOS isoforms in bull spermatozoa. *Anat. Histol. Embriol.* 32: 321-325.

- MEISTER, A., ANDERSON, M.E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 711-60.
- MELLO FILHO, A.C., HOFFMAN, M.E., MENEGHINI, R. (1983) Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochem. J.* 218: 273-275.
- MEIRELLES F.V., CAETANO, A.R., WATANABE, Y.F., RIPAMONTE, P., CARAMBULA, S.F., MERIGHE, G.K., GARCIA, S.M., (2004) Genome activation and developmental block in bovine embryos. *An. Reprod. Sci.* 82-83: 13-20.
- MENDES, J.O.Jr, BURNS, P.D., DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F., SEIDEL, G.E.Jr. (2003) Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology.* 2: 331-340.
- MIDDENDORFF, R., MULLER, D., WICHWERS, S., HOLSREIIN, A.F., DAVIDOFF, M.S. (1997) Evidence for production and functional activity of nitric oxide in seminiferous tubules and blood vessels of the human testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 4154-4161.
- MIRAGLIA, E., RULLO, M.L., BOSIA, A., MASSOBRIO, M., REVELLI, A., GHIGO, D. (2007) Stimulation of the nitric oxide/ cyclic guanosine monophosphate signaling pathway elicits human sperm chemotaxis *in vitro*. *Fertil. Steril.* 87: 1059-1063.
- MIRAGLIA, E., de ANGELIS, F., GAZZANO, E., HASSANPOUR, H., BERTAGNA, A., ALDIERI, E., REVELLI, A., GHIGO, D. (2011) Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway. *Reprod.* 141: 47-54.
- MIRANDA, K.M., ESPEY, M.G., JOURD'HEUIL, D., GRISHAM, M.B., FUKUTO, J.M., FEELISCH, M., WINK, D.A. (2000) The Chemical Biology of Nitric Oxide. *In: Ignarro, L.J. (ed.) Nitric oxide. Biol. Pathobiol.* San Diego: Academic Press, p. 41-42, 50-51.

- MISRO, M.M., CHOUDHURY, L., UPRETI, K., GAUTAM, D., CHAKI, S.P., MAHAJAN, A. S., BABBAR, R. (2004) Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative stress in subjects presenting a normal semen profile. *Intern. J. Androl.* 27: 82-87.
- MIYAZAWA, T., YASUDA, K., FUJIMOTO, K. (1987) *Anal. Lett.* 20, 915.
- MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. (1991) Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
- MONCADA, S., HIGGS, E.A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl. J. Med.* 329: 2002-2012.
- MORI, H.; KOGURE, M.; KUMABE, K. (1992) Determination of Hydroperoxides with the Use of Immobilized Glutathione Peroxidase in a Flow System. *Anal. Lett.* 25: 1643-1656.
- MUJICA, A., NERI-BAZAN, L., TASH, J., URIBE, S. (1994) Mechanism for procaine-mediated hyperactivated motility in guinea pig spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 38: 285-292.
- MUKAI, C., OKUNO, M. (2004) Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar. *Biol. Reprod.* 71: 540-547.
- MÜLLER, K., POMORSKI, T., MÜLLER, P., ZACHOWSKI, A., HERRMANN, A. (1994) Protein-dependent translocation of aminophospholipids and asymmetric transbilayer distribution of phospholipids in the plasma membrane of ram sperm cells. *Biochem* 33: 9968-9974.
- MÜLLER, K., POMORSKI, T., MÜLLER, P., HERRMANN, A (1999) Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *J. Cell. Sci.* 112: 11-20.

- NAGY, S., HALLAP, T., JOHANNISSON, A., RODRIGUEZ–MARTINEZ, H. (2004) Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen – thawed bovine spermatozoa during a 4h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 80: 225-235.
- NATHAN, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6: 3051-3064.
- NEILD, D.M., GADELLA, B.M., COLENBRANDER, B., AGÜERO, A., BROUWERS, J.F.H.M. (2002) Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 58: 295-298.
- NICHOL, R., HUNTER, R.H.F., LEESE, H.J., COOKE, G.M. (1992) Concentrations of energy substrates in porcine oviduct fluid and blood plasma during the peri-ovulatory period. *J. Reprod. Fertil.* 96: 699-707.
- O'BRYAN, M.K., ZINEI, A., SCHENG, Y., SCHLEGEL, P. (1998) Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. *Fertil. Steril.* 70: 1143-1147.
- O'FLAHERTY, C., BEORLEGUI, N., BECONI, M.T. (2003) Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *Intern. J. Adrol.* 26: 109-114.
- O'FLAHERTY, C., RODRIGUEZ, P., SRIVASTAVA, S. (2004) L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Bioch. Bioph. Acta* 1674: 215-221.
- O'FLAHERTY, C., de LAMIRANDE, E., GAGNON C. (2006) Reactive oxygen species modulation independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 1045–1055.
- ORWAR, O., FISHMAN, H.A., ZIV, N.E., SCHELLER, R. H., ZARE, R.N. (1995) Use of 2,3-Naphthalenedicarboxaldehyde Derivatization for Single-Cell Analysis of

Glutathione by Capillary Electrophoresis and Histochemical Localization by Fluorescence Microscopy. *Anal. Chem.* 67: 4261-4268.

PAES de CARVALHO, C. (2002) Efeito do óxido nítrico na capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos. Tese (Mestrado em produção animal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro– UENF, 15p.

PAES de CARVALHO, C., CALDAS-BUSSIÈRE, M. C., CARVALHO, F. P., UENO, V. G., QUIRINO, C. R. (2003) Efeito do óxido nítrico na capacitação *in vitro* induzida ou não pela heparina em espermatozoide bovino. *Acta Sci. Vet.* (supl 01) p. 516.

PAP, E.H., DRUMMEN., G.P., WINTER, V.J., KOOIJ, T.W., RIJKEN, P., WIRTZ, K.W., OP DEN KAMP, J.A, HAGE, W.J., POST, J.A. (1999) Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C₁₁BODIPY. *FEBS Lett* 453: 278-282.

PARINAUD, J., MILHET, P. (1996) Progesterone induces Ca-dependent 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate increase in human sperm. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 1357-1360.

PARKS, J.E., ARION, J.W., FOOTE, R.H. (1987) Lipids of the plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 37: 1249-1258.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., WINER, M.A., FIRST, N.L (1988) Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38: 1171-1180.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., UGUZ, C., FIRST, N.L. (1994) Differences in the role of cyclic adenosine 3` 5`- monophosphate during capacitation of bovine sperm by heparin or oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 41: 1099-1108.

- PARRISH, J.J., EID, L. (1994 b) Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol. Reprod.* 51: 1232-1237.
- PARSONS, T.J., MUNIEC, D.S., SULLIVAN, K., WOODYATT, N., ALLISTON-GREINER, R., WILSON, M.R., BERRY, D.L., HOLLAND, K.A., WEEDN, V.W., GILL, P., HOLLAND, M.M. (1997) A high observed rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat. Genet.* 14: 363-368.
- PEÑA, F.J., JOHNNISSON, A., WALLGREN, M., MARTINEZ-RODRIGUEZ, H. (2003) Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 85-98.
- PHELPS, B.M., PRIMAKOFF, P., KOPPEL, D.E., LOW, M.G., MYLES, D.G. (1988) Restricted lateral diffusion of PH-20, a PI-anchored sperm membrane protein. *Science* 240: 1780–1782.
- PICCOLI, G., FIORANI, M., BIAGIARELLI, B., PALMA, F., POTENZA, L., AMICUCCI, A., STOCCHI, V. (1994) Simultaneous high-performance capillary electrophoretic determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells in the femtomole range. *J. Chromatogr. A* 676: 239-246.
- PODEROSO, J.J., CARRERAS, M.C., LISDERO, C., RIOBO, N., SCHOPFER, F., BOVERIS, A. (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 328: 85-92.
- POOK, M., KRAUSE, W., ROHRIE, B. (1999) Coping with infertility: distress and changes in sperm quality. *Hum. Reprod.* 14: 1487-1492.
- PURDY, P.H.; FOX, M.H.; GRAHAM, J.K. (2005) The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. *Cryobiology* 51: 102-112.

- RAGGI, M. A.; NOBILE, L.; GIOVANNINI, A. G. (1991) Spectrophotometric determination of glutathione and of its oxidation product in pharmaceutical dosage forms. *J. Pharmac. Biomed. Anal.* 9: 1037-1040.
- RAWE V.Y., GALAVERNA, G.D., ACOSTA, A.A., OLMEDO, S.B., CHEMES, H.E. (2001) Incidence of tail structure distortions associated with dysplasia of the fibrous sheath in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 16: 879-886
- REERS, M., SMITH, T.W., CHEN, L. B. (1991) J-aggregate formation of carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 30: 4480-4486.
- REVELLI, A., COSTAMAGNA, C., MOFFA, F., ALDIERI, E., OCHETTI, S., BOSIA, A., MASSOBRIO, M., LINDBLOM, B., GHIGO, D. (2001) Signaling pathways of nitric oxide-induced acrosome reaction in human sperm. *Biol. Reprod.* 64: 1708-1712.
- ROCCA, J., GIL, M.A., HERNANDEZ, M., PARRILLA, I., VAZQUEZ, J.M., MARTINEZ, A.E. (2004) Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J. Androl.* 25: 397-405.
- RODRIGUEZ, P.C., O'FLAHERTY, C.M., BECONI, M.T., BEORLEGUI, N.B. (2004) Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. *Anim. Reprod. Sci.* 85: 231-242.
- RODRIGUEZ, P.C., O'FLAHERTY, C.M., BECONI, M.T., BEORLEGUI, N.B. (2004) Nitric oxide induces acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia* 37: 166-172.
- RODRIGUEZ, P.C., VALDEZ, L.B., ZAORNYJ, T., BOVERIS, A., BECONI, M.T. (2011) Nitric oxide and superoxide anion production during heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 46: 74-81.

- ROESSNER, C., PAASCH, V., GLANDER, H.J., GRUNEWALD, S. (2010) Activity of nitric oxide synthase in mature and immature human spermatozoa. *Andrologia* 42: 132-137.
- ROSENKRANZ, C., HOLZMANN, A., DICKIE, M.B. (1994) In-Vitro-Fertilization mit transmigriertem Rinder-samen. *Reprod. Dom. Anim.* 29: 326-332.
- ROSENKRANZ, C., HOLZMANN, A. (1995) Der Einfluß von Samenaufbereitung and Kulturmedium auf den IVF-Erfolg beim Rind. *J. Vet. Med. A.* 42: 139-143.
- ROSENKRANZ, C., HOLZMANN, A. (1997) The effect of sperm preparation on the timing of penetration in bovine in vitro fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 46: 47-53.
- ROSS, D., MOLDEUS, P. (1991) Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation*. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 151-70.
- ROSSELLI, M., KELLER, P.J., DUBEY, R.K. (1998) Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reprod. Up*, 4: 3-24.
- ROTRUCK, J. T., POPE, A. L., GANTHER, H. E., SWANSON, A. B., HAFEMAN, D. G., HOEKSTRA, W. G. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 588-590.
- ROUSSEAU, D.L., SINGH, S., CHING, Y.C., SASSAROLI, M. (1998) Nitrosyl cytochrome c oxidase. Formation and properties of mixed valence enzyme. *J. Biol. Chem.* 263: 5681-5685.
- ROY, S. C., ATREJA, S. K. (2008) Tyrosine phosphorylation of a 38-kDa capacitation-associated buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm protein is induced by L-arginina and regulated though a cAMP/PKA-independent pathway. *Intern. J. Androl.* 31: 12-24.

- RUBBO, H., DARLEY-USMAR, V., FREEMAN, B. A. (1996) Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 809-820.
- RUIZ-PENSINI, E., DIEZ, C., LAPEÑA, C., PEREZ-MARTOS, A., MONTOYA, J., ALVAREZ, E., ARENAS, J., LOPEZ-PEREZ, M.J. (1998) Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin. Chem.* 44: 1616-1620.
- SAADELDIN, I.M., KIM, B., LEE, B., JANG, G. (2011) Effect of different culture media on the temporal gene expression in the bovine developing embryos *Theriogenology* 75: 9995-1004.
- SAEKI, K., KATO, H., HOSOI, Y., MIYAKE, M., UTSUMI, K., IRITANI, A. (1991) Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 35: 1051-1058.
- SALEH, R.A., AGARWAL, A., KANDIRALI, E. (2002) Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 78: 1215-1224.
- SANTORO, G., ROMEO, C., IMPELLIZZERI, P., IENTILE, R., CUNTRONEO, G., TRIMARCHI, F. (2001) Nitric oxide syntase patterns in normal and varicocele testis in adolescents. *BJU Int.* 88: 967-973.
- SANTOS-SACCHI, J., GORDON, M. (1980) Induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa by cGMP analogues. *J. Cel. Biol.* 85: 798-803.
- SARIÖZKAN, S., BUCAK, M.N., TUNCER, P.B., ULUTAS, P.A., BILGEN, A. (2009) The influence of cysteine and taurine on microscopicoxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* 58: 134-138.
- SARLOS, P., MOLNAR, A., KOKAI, M., GABOR, G.Y., RÁTKY, J. (2002) Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica* 50: 235-245.

- SCANDALIOS, J.G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses Brazilian. *J Med Biol Res* 38, 995-1014.
- SCHWEIZER, M., RICHER, C. (1994) Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 204: 169-175.
- SCHRAMMEL, A., BEHREND, S., SCHMIDT, K., KOESLING, D., MAYER, B. (1996) Characterization of 1-H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,a]quinoxalin-1-one as a Heme-Site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol. Pharm.* 5: 1-5.
- SENGOKU, K., TAMATE, K., YOSHIDA, T., TAKAODA, Y., MIYAMOTO, T., ISHIKAWA, M. (1998) Effects of low concentration of nitric on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 69: 522-527.
- SENTUERKER, S., KARAHALIL, B., INAL, M., YILMAZ, H., MUESLUEMANOGLU, H., GEDIKOGLU, G., DIZDAROGLU, M. (1997) Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS Lett.* 416: 286-290.
- SHAN, X., AW, T.Y., JONES, D.P. (1990) Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol. Ther.* 47: 61-71.
- SHARMA, R.K., AGARWAL, A. (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48: 835-850.
- SIES, H. (1986) Biochemistry of Oxidative Stress. *Angew. Chem.* 25: 1058-1071.
- SILVA, D.L.V., ALVES, R.E., FIGUEIREDO, R.W., MACIEL, V.T., FARIAS, J.M., AQUINO, A.R.L. (2009) Physical, physical-chemical and sensorial characteristics of coconut water from green-dwarfed coconut palm from conventional and organic production. *Ciências e Agrotecnologias, Larvas*, 33: 1079-1084.

- SILVA, P.F.N., GADELLA, B.M. (2006) Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65: 958-978.
- SPINACI, M., DE AMBROGI, M., VOLPE, S., GALEATI, G., TAMANINI, C., SEREN, E. (2005) Effect of staining and sorting on boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro blastocyst development. *Theriogenology* 64: 191-201.
- SREEJITH, J.N, BRAR, A.S., AHUJA, C.S., SANGHA, S.P.S., CHAUDHARY, K.C. (2006) A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Anim. Reprod. Sci.* 96: 21–29.
- STAUSS, C.R., VOTTA, T.J., SUAREZ, S.S. (1995) Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.* 53: 1280-1285.
- ST JOHN, J.C., JOKHI, R.P., BARRATT, C.L. (2005) The impact of mitochondrial genetics on male infertility. *Int. J. Androl.* 28: 65-73.
- STOREY, B.T. (1995) Interaction between gametes leading to fertilization: the sperm's eye view. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 927–942.
- STRACHAN, T., READ, A.P. (1997) Human Genetics, 3rd Edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
- SUAREZ, S.S., HO, H-C. (2003) Hyperactivated motility in sperm. *Reprod. Dom. Anim.* 38: 119-124.
- SUAREZ, S.S. (2007) Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 103-110.
- SUELDO, C.E., OEHNINGER, S., SUBIAS, E., MAHONY, M., ALEXANDER, N.J., BURKMAN, L.J., ACOSTA, A.A. (1993) Effect of progesterone on human zona

- pellucida sperm binding and oocyte penetrating capacity. *Fertil. Steril.* 60: 137-140.
- SUTOVSKY, P., MCCAULEY, T.C., SUTOVSKY, M., DAY, B.N. (2003) Early degradation of paternal mitochondria in domestic pig (*Sus scrofa*) is prevented by selective proteasomal inhibitors lactacystin and MG132. *Biol. Reprod.* 68: 1793-1800.
- SZETO, H.H. (2006) Mitochondria-Targeted peptide antioxidants: Novel neuroprotective agents. *AAPS J.* 8 (3) article 62.
- TATOYAN, A., GIULIVE, C., (1998) Purification and characterization of a nitric oxide synthase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273: 11044-11048.
- TELFER, J.F., NORMAN, J.E., CAMERON, J.T. (1995) Identification of nitric oxide syntase in human uterus. *Hum. Reprod.* 10: 19-23.
- TROIANO, L., GRANATA, A.M., COSSARIZA, A., KALASHNIKOVA, G., BIANCH, R., PINI, G., TROPEA, F., CARANI, C., FRANCESCHI, C. (1998) Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in Human sperm cells: A flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Experim. Cell. Res.* 241: 384-393.
- VILLEGAS, J., KEHR, K., SOTO, L., HENKEL, R., MISKA, W., SÁNCHEZ, R. (2003) Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. *Andrologia* 35: 227-232
- VISCONTI, P.E., BAILEY, J.L., MOORE, G.D., PAN, D., OLDS-CLARKE, P., KOPF, G.S. (1995) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* 121: 1129-1137.
- VISCONTI, P.E., KOPF, G.S. (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 1-6.

- VRENDENBURGH-WILBERG, W.L., PARRISH, J.J. (1995) Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 40: 490-502.
- XU, K.P., GREVE, T. (1988) A detailed analyses of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 82: 127-134.
- WALDMAN, S.A., MURAD, F (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharm. Rev.* 39: 163-196.
- WANG, X., FALCONE, T., ATTARAN, M., GOLDBERG, J.M., AGARWAL, A., SHARMA, R.K. (2002) Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril* 78: 1272-1277.
- WILLIANMS, G.T., SMITH, C.A. (1993) Molecular regulation of apoptosis genetic controls on cell death. *Cell Press* 74: 777-779.
- WU, T-W., HASHIMOTO, N., WU, J., CAREY, D., LI, R-K., MICKLE, D.A.G., WEISEL,R.D. (1990) The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. *Biochem. Cell. Biol.* 68: 1189-1194.
- YANAGHIMACHI, R. (1969) *In vitro* capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 18: 275-286.
- YANAGHIMACHI, R. (1994) Mammalian fertilization. *In*: Knobil E., Neill J.D. (eds) *The Physiology of Reproduction.*, vol. 1, 2^a. ed. New York: *Raven Press*, p. 189-317.
- YAO, Y., HO, P., YEUNG, W.S. (2000) Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 73: 680-686.
- YEOMAN, R.R., JONES, W.D., RIZK, B.M. (1998) Evidence of nitric oxide regulation of hamster sperm hyperactivation. *J. Androl.* 19: 58-64.

- ZAMBERLAN, G.O (2009) Regulação da expressão da óxido nítrico sintase induzível em células da granulosa bovina e seu envolvimento com a dominância folicular. *Dissertação apresentada ao curso de mestrado da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM – RS. Pg 15.*
- ZAMIR, N., BARKAN, D., KEYNAN, N., NAOR, Z., BREITBART, H. (1995) Atrial natriuretic peptide induces acrossomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am. J. Physiol.* 269: E216-E221.
- ZHAO, Y., BRANDISH, P.E., DIVALENTIN, M., SCHELVIS, J.P., BABCOCK, G.T., MARLETTA, M.A. (2000) Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochem.* 39: 10848-10854.
- ZEMOJTEL, T., KOLANCZYK, M., KOSSLER, N., STRICKER, S., LURZ, R., MIKULA, I., DUCHNIEWICZ, M., SCHUELKE, M., GHAFOURIFAR, P., MARTASEK, P., VINGRON, M., MUNDLOS, S. (2006) Mammalian mitochondrial nitric oxide syntase: characterization of a novel candidate. *FEBS Lett.* 580: 455-462.
- ZINI, A., de LAMIRANDE, E., GAGNON, C. (1995) Low levels of nitric oxide promote sperm capacitation *in vitro*. *J. Androl.* 16: 424-431.
- ZINI, A., O'BRYAN, M.K., MAGID, M.S., SCHLEGEL, P.N. (1996) Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide syntase in human testis, epididymis, and vias deferents suggest a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol. Reprod.* 55: 935-941.
- ZÚCCARI, C.E.S.N. (1998) Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina. Botucatu, 121p. Tese Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

5- ARTIGO SUBMETIDO PARA O ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA (ABMVZ)

Efeito do 8-Bromo-GMPc, análogo do GMPc, na capacitação *in vitro* de espermatozoides
bovinos criopreservados

Effect of 8-Bromo-cGMP, analog of cGMP, in sperm capacitation *in vitro* bovine
cryopreserved

Leal, A.C.M.S.; Caldas-Bussiere*, M. C.; Quirino, C.R.

Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
Avenida Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, 28013-
602, Brasil

Corresponding author: Tel.: +55 22 2739 7285; Fax.:+55 22 27397194

E-mail address: claracal@uenf.br (M.C. Caldas-Bussiere)

RESUMO

Avaliaram-se o papel da guanosina de monofosfato cíclico (GMPc) por meio da adição do 8-bromo-GMPc (Br-GMPc), análogo do GMPc, no meio de capacitação *in vitro* (4 h) de espermatozoides criopreservados bovinos, na percentagem da motilidade, vigor, capacitação e reação acrossômica. Adicionaram-se diferentes concentrações (2,5; 5; 7,5 e 10 mM) do Br-GMPc no meio capacitante. A adição de 5 mM do Br-GMPc aumentou ($P<0,05$) a motilidade (20%) e o vigor (32,1%) comparado com o controle. Contudo, alta concentração (10 mM) do Br-GMPc diminuiu ($P<0,05$) a motilidade (13,1%) e o vigor (22%). A porcentagem de espermatozoides capacitados aumentou (26%) e a de espermatozoides com acrossoma reagido diminuiu (41,6%) comparado com o controle e demais tratamentos ($P<0,05$) após a adição de 5 mM do Br-GMPc. Concentração elevada (10 mM) do Br-GMPc resultou na diminuição da porcentagem de espermatozoides capacitados e aumento da porcentagem de espermatozoides com acrossoma reagido ($P<0,05$), sugerindo que os espermatozoides foram estimulados a capacitar e em seguida, reagir o acrossoma. Esses resultados indicam que: 1) o GMPc está envolvido no controle da motilidade, vigor, capacitação e reação acrossômica *in vitro* 2) o GMPc apresenta efeito dual dependendo de sua concentração no meio capacitante de espermatozoides bovinos.

Palavras-chave: bovino, GMPc, capacitação espermática, clortetraciclina, motilidade

ABSTRACT

The role of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) was evaluated by the addition of 8-bromo-cGMP (Br-cGMP), analogue of cGMP, in the *in vitro* (4 h) capacitation medium of cryopreserved bovine spermatozoa on percentage of motility, vigor, capacitation and acrosome reaction. Different concentrations, 2.5, 5, 7.5 and 10 mM of Br-cGMP were added in the capacitation medium. The addition of 5 mM Br-cGMP increased ($P<0.05$) motility (20%) and vigor (32.1%) compared to control. However, high concentration (10 mM) of Br-cGMP decreased ($P<0.05$) motility (13.1%) and vigor (22%). The percentage of capacitated spermatozoa increased (26%) and decreased spermatozoa with acrosome reaction (41.6%) compared with control and other treatments ($P<0.05$) after addition of 5 mM Br-cGMP. High concentration (10 mM) of Br-cGMP resulted in a decrease in the

percentage of capacitated spermatozoa and increased the percentage of spermatozoa with acrosome reaction ($P < 0.05$), suggesting that these cells were stimulated to capacitated and then the acrosome reaction. These results indicate that: 1) cGMP is involved in controlling motility, vigor, capacitation and acrosome reaction *in vitro* 2) cGMP has dual effect depending on its concentration in the capacitation medium bovine spermatozoa.

Keywords: bovine, cGMP, sperm capacitation, clortetraciline, motility

INTRODUÇÃO

A capacitação se caracteriza por uma sequência de mudanças bioquímicas que levam à desestabilização da membrana do espermatozoide, à modificação da motilidade, ao aumento do influxo de cálcio e do pH citosólico, à diminuição das proteínas ligadas a calmodulina, ao aumento do AMPc (Visconti, 1998; Herrero *et al.*, 2001), bem como aumento no número de proteínas fosforiladas nos resíduos de tirosina, (Chamberland *et al.*, 2001; Jagan Mohanarao e Atreja, 2011). Todas estas mudanças são necessárias para que ocorra a reação acrossômica (RA) em resposta à ligação do espermatozoide com a zona pelúcida (Visconti, 1998; Herrero *et al.*, 2001).

Tanto a capacitação espermática como a RA são imprescindíveis para o sucesso da fertilização do oócito *in vitro* e *in vivo*, e dependem da ação do NO para que ocorram em bovinos (Ferreira-Berbari *et al.*, 2010; Leal *et al.*, 2009).

Uma das principais vias de ação do NO é a da guanosina monofosfato cíclica (GMPc), um nucleotídeo cíclico derivado da guanosina trifosfato (GTP), sintetizada pela guanilato ciclase solúvel (GCs) (Murad, 1994). A GCs age como receptora molecular para o NO (Ignarro, 2000). Ao se ligarem, o complexo (GCs-NO) ativa a conversão da guanosina trifosfato (GTP) em GMPc (Garthwaite *et al.*, 1995) aumentando sua concentração em até 200 vezes (Ignarro, 2000).

A GMPc, conhecida por agir na célula alvo pela regulação da atividade da fosfodiesterase (PDE) e canais ligados a nucleotídeos cíclicos (CNGs; Hanafy *et al.*, 2001), atua como segundo mensageiro em resposta à ligação de hormônios peptídeos ligados a membrana celular (Bredt e Snyder, 1994) e modulação da síntese de NO (Ignarro, 2000; Miraglia *et al.*, 2007; 2011).

O papel do GMPc na capacitação ou RA tem sido demonstrado em humanos e roedores pela inibição da sua síntese (Santos-Sacchi e Gordon, 1980; Miraglia *et al.*, 2007), adição de análogos [dibutyryl-GMPc (8-bromo-GMPc); Santos-Sacchi e Gordon, 1980; Cisneros-Mejorado e Herrera, 2012] e inibição da ação do GMPc pelo bloqueio de canais ligados a nucleotídeos cíclicos (Cisneros-Mejorado e Herrera, 2012) no meio de cultivo. Na motilidade, o papel do GMPc foi avaliado em humanos pela adição do inibidor da fosfodiesterase específica da GMPc (Sildenafil; Lefièvre *et al.*, 2000), inibidor da GCs [1*H*-(1,2,4) oxadiazolo-(4,3-*a*)quinoxalin-1-ona – ODQ], S-nitrosoglutathione, doador de NO (GSNO, Miraglia *et al.*, 2007, 2011) e pelo 8-bromo-GMPc (Miraglia *et al.*, 2011).

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito dose resposta da ação do análogo do GMPc (8-bromo-GMPc) na porcentagem da motilidade, vigor, capacitação e RA no meio capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos, visto que não há nenhum relato na literatura de sua ação nessa espécie.

MATERIAL E MÉTODO

Todos os reagentes utilizados foram da marca Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

O meio-base utilizado na capacitação espermática foi o Tyrodes modificado (TALP-sp) (Parrish *et al.*, 1988), suplementado com 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

O meio de lavagem empregado na capacitação espermática foi o Tyrodes, modificado (Chamberland *et al.*, 2001).

Os meios foram esterilizados antes do uso por filtração com unidades filtrantes estéreis de 0,22 µm (TPP – 99722 – Suíça), tendo passado por um período de 1 h de pré-incubação em estufa a 38,5 °C com atmosfera umidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ para estabilização. Após esse processo, foram armazenados à temperatura de 4° C. O 8-bromo-GMPc (PM 446,1) foi diluído e colocado no meio de capacitação somente quando os experimentos se iniciaram.

Foram utilizados espermatozoides criopreservados comercialmente de 3 touros (*Bos indicus*) da raça Nelore, testados para FIV. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UENF) protocolo n° 49, validade 8/04/2013).

Os espermatozoides após o descongelamento foram submetidos à centrifugação (700 x g/10 min) em um gradiente de Percoll 45 e 90% (Nutricell, São Paulo, Brasil) (Parrish e Eid, 1994), com o objetivo de separar os espermatozoides com maior viabilidade para uso. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento formado (*pellet*) foi lavado em 5 mL de meio de lavagem (Chamberland *et al.*, 2001) e submetido à nova centrifugação (200 x g/3 min). O sedimento resultante foi diluído com 200 µL de meio TALP-sp com heparina (TALP-sp) e em seguida, calculada a concentração espermática.

A capacitação espermática *in vitro* foi induzida em 200 µL de meio de capacitação, acrescido de 20 µg/mL de heparina (T-H) em estufa a 38,5° C, com atmosfera umidificada com 95% de ar e 5% de CO₂, por um período de 4 h (Parrish, 1988). A concentração espermática foi ajustada para 50 x 10⁶ espermatozoides/ mL.

A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados segundo o CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Manual ... 1998) utilizando microscópio de luz direta, aumento 700x (ZEISS, Jenamed Germany, Suíça).

A capacitação foi avaliada utilizando a coloração de clortetraciclina (CTC), como descrito por Cormier *et al.* (1997), com algumas modificações. A solução estoque de CTC (0,75 mM CTC, 20 mM tris-base e 5 mM DL-cysteine) foi preparada diariamente. Foram adicionados 15 µL da solução final de CTC [300 mL de solução estoque de CTC misturado com 10 µL de paraformoldeído (4%) em 20 mM de tris-base e 60 µL de 0,22 M de 1,4 diazabicyclo octane - DABCO (Invitrogen Molecular Probe, Eugene, OR, USA)] a 15 µL de espermatozoide. Logo a seguir, 5 µL dessa suspensão corada foi colocada na lâmina e coberta por uma laminula e observada no microscópio de epifluorescência (NIKON - Eclipse TE300/TE200, Melville, NY, USA) (40x). Um total de 200 espermatozoides foram contados e classificados em 3 grupos, como descrito por Fraser *et al.* (1995): F (fluorescente), espermatozoide intacto e não capacitado, fluorescendo toda sua superfície; C (capacitado) espermatozoide capacitado intacto, perda da fluorescência na região pós acrossomal e RA, espermatozoide com o acrossoma reagido, perda da fluorescência na região pós acrossomal e acrossomal, expressando fluorescência apenas na peça intermediária.

Avaliou-se o efeito dose-resposta do aumento de GMPc no meio de capacitação espermática *in vitro* induzida pela heparina, por meio da adição de diferentes concentrações

(2,5; 5; 7,5 e 10 mM) do 8-Bromo-GMPc no meio de cultivo por 4 h. O controle consistiu de espermatozoides capacitados em meio T-H. O experimento foi concluído com 6 repetições por animal (n=18)

O dados foram analisados no programa SAS/1996 e submetidos à análise de variância (PROC GLM) para verificar o efeito das diferentes concentrações de Br-GMPc na porcentagem da motilidade, vigor, capacitação e reação acrossomal após 4 h de cultivo. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacitação do espermatozoide está associada com uma concentração ideal de óxido nítrico (NO) no meio de cultivo (Miraglia *et al.*, 2011; Jagan Mohanarao e Atreja, 2011; Cisnero-Mejorado e Herrera, 2012), espécie de nitrogênio reativa que ativa a GCs e subsequentemente sintetiza o GMPc, sendo esta a principal via de sinalização do NO (Ignarro, 2000). Leal *et al.* (2009) demonstraram que o NO está envolvido no controle da motilidade, vigor e capacitação de espermatozoides bovinos criopreservados durante a capacitação. No presente estudo, nosso objetivo foi avaliar o papel do GMPc no meio de capacitação (4 h) de espermatozoides criopreservados de bovino após a adição do seu análogo, Br-GMPc, em diferentes concentrações (2,5; 5; 7,5 e 10 mM).

Observou-se que houve efeito significativo ($P < 0,05$) na porcentagem da motilidade, vigor, capacitação e RA para os tratamentos após 4 h de cultivo em meio capacitante (Fig. 01, 02, 03).

A adição de 5 mM de Br-GMPc aumentou a motilidade progressiva (68,11%) comparada com o controle (55%) e demais tratamentos (2,5; 7,5 e 10 mM de Br-GMPc – 56,6%; 58,3% e 47,7% respectivamente). Conforme se aumentou a concentração do Br-GMPc no meio capacitante (7,5 e 10 mM), a motilidade foi gradativamente diminuindo mostrando o efeito dual do Br-GMPc. No entanto, a adição de 2,5 mM do Br-GMPc no meio capacitante não alterou a motilidade, demonstrando que uma concentração ideal de Br-GMPc é necessária para aumentar a motilidade espermática (Fig. 01).

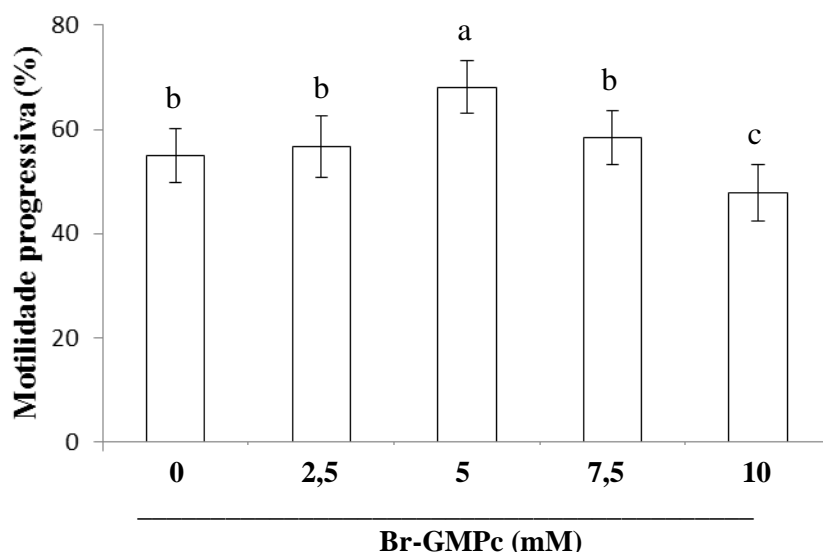


Figura 01- Motilidade progressiva (%) de espermatozoides bovino, após a capacitação *in vitro* (4 h), em resposta a concentrações crescentes do 8-bromo-GMPc (Br-GMPc) adicionadas ao meio de cultivo. Dados são apresentados como média \pm DP de seis replicatas. Diferentes letras sobre barras indicam diferenças ($P < 0,05$).

Lefièvre *et al.* (2000) demonstraram um aumento dos parâmetros da motilidade após a inibição da fosfodiesterase específica do GMPc (PD5), isoenzima responsável por sua hidrólise, pelo uso de 100 e 200 μ M de sildenafil no meio de cultivo (30, 90 e 180 min) de espermatozoides humanos. Essa inibição gera um aumento da concentração do GMPc e subsequentemente ativação da via de sinalização de proteínas cinases dependente de GMPc envolvidas na motilidade (Miraglia *et al.*, 2011), demonstrando que o aumento de GMPc no meio de capacitação está relacionado com o aumento da motilidade espermática.

Apesar de Miraglia *et al.* (2007) não observarem alteração da motilidade espermática em humanos após a adição de 1 mM do Br-GMPc no meio capacitante (20 min), Miraglia *et al.* (2011) demonstraram um aumento da motilidade após a adição de uma concentração menor (0,5 mM de Br-GMPc) no meio de cultivo por um período mais longo (30, 60 e 90 min). Esses resultados demonstram que em humanos concentrações dez vezes menores de GMPc são capazes de induzir um aumento da motilidade comparado com bovinos.

A avaliação da percentagem de espermatozoides e tipos de movimento tem sido parâmetros utilizados para avaliação da qualidade espermática e conseqüentemente, a fertilidade do macho. O conhecimento mais profundo do papel da sinalização do GMPc na fisiopatologia da motilidade espermática pode ajudar a melhorar farmacologicamente a fertilização *in vitro* (FIV).

A adição de 5 mM de Br-GMPc aumentou o vigor (3) comparado com o controle (2,2) e demais tratamentos (2,5; 7,5 e 10 mM de Br-GMPc – 2,2; 2,6 e 1,7 respectivamente). Conforme se aumentou a concentração do Br-GMPc no meio capacitante (7,5 e 10 mM), o vigor foi gradativamente diminuindo mostrando o efeito dual do Br-GMPc. No entanto, a adição de 2,5 mM do Br-GMPc no meio capacitante não alterou o vigor, demonstrando que uma concentração ideal de Br-GMPc é necessária para aumentar o vigor espermático (Fig. 02).

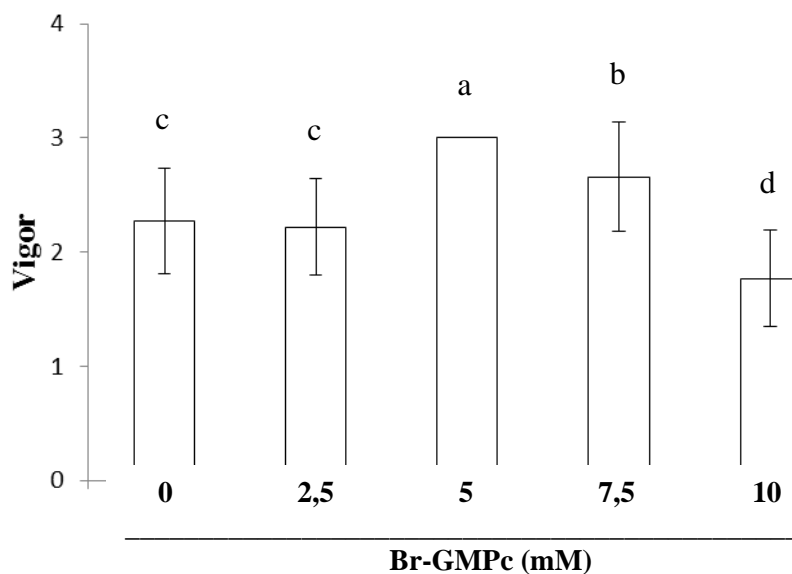


Figura 02- Percentagem do vigor de espermatozoides bovinos após a capacitação *in vitro* (4 h), em resposta a concentrações crescentes do 8-bromo-GMPc (Br-GMPc) adicionadas ao meio de cultivo. Dados são apresentados como média ± DP de seis replicatas. Diferentes letras sobre barras indicam diferenças ($P < 0,05$).

Não há nenhum trabalho na literatura relacionando o vigor espermático com GMPc no meio capacitante. Contudo, o aumento do vigor após a adição de 5 e 7,5 mM de Br-GMPc pode ser explicado pelo estímulo da atividade metabólica celular e aumento da concentração de cálcio mitocondrial (Miraglia *et al.*, 2011), resultando em aumento na concentração de ATP (Sengoku *et al.*, 1998), principal fonte de energia para o batimento flagelar.

Receptores para GCs, enzima responsável pela ativação do GMPc, foram descritos na superfície de espermatozoides de camundongos recobrando o acrossoma e peça intermediária (Huang *et al.*, 2006), sugerindo seu papel na fisiologia do espermatozoide em processos de motilidade, vigor, capacitação espermática e RA.

A adição de 2,5 mM de Br-GMPc no meio de cultivo não alterou a porcentagem de espermatozoides capacitados (40,7%) comparado com o controle (43,4%), enquanto 5 mM de Br-GMPc aumentou a capacitação (54,7%). Concentrações mais elevadas (7,5 e 10 mM) de Br-GMPc no meio capacitante diminuíram (33,9 e 29,5%; respectivamente) a porcentagem de espermatozoides capacitados (Fig. 03).

Espermatozoides cultivados em presença de 2,5; 5 e 7,5 mM de Br-GMPc apresentaram diminuição na porcentagem de RA (19,9; 16,3 e 21,5% respectivamente) comparado com o controle (27,9%). Contudo, concentração elevada (10 mM) de Br-GMPc aumentou a RA (44,7% - Fig. 03), sugerindo que esses espermatozoides foram estimulados a capacitar e em seguida, reagir o acrossoma diminuindo seu potencial fecundante, pois uma vez reagidos, não mais se ligam ao oócito.

A concentração de GMPc no espermatozoide é baixa comparado com a de AMPc e permanece inalterada durante a capacitação (Stein e Fraser, 1984). No entanto, o GMPc é a molécula responsável por aumentar a concentração de AMPc por meio da ativação de canais de potássio (K^+) no interior do espermatozoide (Cook e Babcock, 1993). Esse aumento é responsável por ativar a cascata que leva a fosforilação de proteínas pela ativação da tirosina cinase associada com o aumento da capacitação espermática em bovino (Galantino-Homer *et al.*, 1997) e bubalino (Jagan Mohanarao e Atreja, 2011), e da RA em bovino (Rodriguez *et al.*, 2005).

Estudos sobre o papel do GMPc na capacitação espermática ainda são escassos. Mais pesquisas são necessárias para um maior entendimento do seu mecanismo de ação.

Canais ligados a nucleotídeos cíclicos (GMPc) foram localizados ao longo da peça intermediária e peça principal de espermatozoides de bovinos (Wiesner *et al.*, 1998) e estão associados na indução da capacitação em camundongos (Cisnero-Mejorado e Herrera, 2012). A adição de 0,8 mM de Br-GMPc, tanto no meio capacitante como não capacitante, aumentou a percentagem de espermatozoides capacitados após 1 h de cultivo (Cisnero-Mejorado e Herrera, 2012). Essas diferenças em relação ao presente experimento podem ser explicadas devido a maior sensibilidade dos camundongos ao GMPc comparado com bovinos.

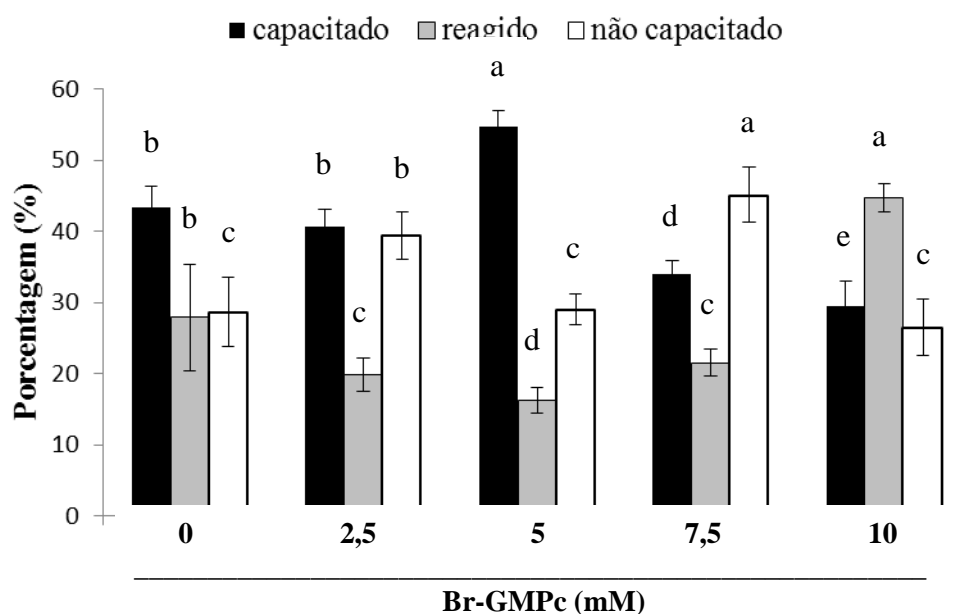


Figura 03- Porcentagem de espermatozoides bovino capacitados, reagidos e não capacitado, após o cultivo *in vitro* (4 h) em resposta as concentrações de Br-GMPc adicionadas ao meio capacitante (T-H). Dados são apresentados como média \pm DP de seis replicatas. Diferentes letras sobre barras indicam diferenças ($P < 0,05$).

Santos-Sacchi e Gordon (1980) demonstraram que a adição de 10 mM de Br-GMPc no meio de capacitação por 1 h, aumentou a RA em cobaias, corroborando os achados deste trabalho. No entanto, em humanos esse aumento ocorreu após a adição de 1 mM de Br-GMPc no meio de cultivo por 4 h (Revelli *et al.*, 2001). Essa diferença pode ser explicada ou porque em humanos a RA é induzida com uma menor concentração de GMPc ou porque

o tempo de cultivo foi muito longo visto que nessa espécie, a capacitação ocorre ao redor de 1 h de incubação (Jaiswal *et al.*, 1998).

Conclui-se que o GMPc modula a motilidade, vigor, capacitação e reação acrossômica de espermatozoides bovinos no meio de cultivo (4 h) e que uma concentração ideal no meio de capacitação é necessária devido a ação do seu efeito dual.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos do LRMGA (CCTA-UENF) Bruna Lomba Dias e Carla Paes de Carvalho pelo apoio durante o experimento e a Pesquisadora Margot Alves Nunes Dode (CENARGEM/ EMBRAPA) pelo auxílio na execução da técnica de CTC no LRMGA-UENF. Esse trabalho teve apoio financeiro do CNPq (477072/2008-2009) e FAPERJ (E-26/111.604/2010). A.C.M.S, LEAL recebeu auxílio/bolsa CAPES. CALDAS-BUSSIÈRE, M.C. é bolsista do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BREDT, D.S., SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann. Rev. Biochem.*, v.63, p.175-95, 1994.

CHAMBERLAND, A., FOURNIER, V., TARDIF, S. et al. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology*, v.55, p.823-835, 2001.

CISNERO-MEJORADO, A., HERRERA, D.P.S. cGMP and cyclic nucleotide-gated channels participate in mouse sperm capacitation. *FEBS Letters*, v.586, p.149-153, 2012.

COOK, S.P., BABCOCK, D.F. Activation of Ca²⁺ permeability by c AMP is coordinated through the pH increase induced by speract. *J. Biol. Chem.*, v.268, p.22408-22413, 1993.

CORMIER, N., SIRARD, M.A., BAILEY, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.*, v.18, p.461-468, 1997.

FERREIRA-BERBARI, J.B.P; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C; PAES DE CARVALHO, C.S. et al. Efeito da inibição da óxido nítrico sintase induzível na capacitação de espermatozóides bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, p.511-520, 2010.

FRASER, L.R. Ionic control of sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.7, p.905-925, 1995.

GALANTINO-HOMER, H.L., VISCINTI, P.E., KOPF, G.S. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate- dependent pathway. *Biol. Reprod.*, v.56, p.707-719, 1997.

GARTHWAITE, J., SOUTHAM, E., BOULTON, C.L. et al. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1-H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharm.*, v.48, p.184-188, 1995.

HANAFY, K.A., KRUMENACKER, J.S., MURAD, F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit.*, v.7, p.801-819, 2001.

HERRERO, M.B.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Tyrosine nitration in human spermatozoa: a physiological function of peroxynitrite, the reaction product of nitric oxide and superoxide. *Mol. Hum. Reprod.*, v.7, p.913-921, 2001.

HUANG, Y.H., WEI, C.C., SU, Y.H. et al. Localization and characterization of an orphan receptor, guanylyl cyclase-G, in mouse testis and sperm. *Endocrinology*, v.147, p.4792-4800, 2006.

IGNARRO, L.J. Introduction and Overview. In: Ignarro, L.J. (ed.) *Nitric oxide. Biology and Pathobiology.*, San Diego: Academic Press, p.12-17, 2000.

JAGAN MOHANARAO, G., ATREJA, S.K. Identification of NO induced and capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Res. Vet. Sci.*, doi:10.1016/j.rvsc.2011.09.017.

JAISWAL, B.S., COHEN-DAYAG, A., TUR-KASPA, I. et al. Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS Letters*, v.427, p.309-313, 1998.

LEAL, A.C.M.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C.; PAES DE CARVALHO, C. S. et al. Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced *in vitro* capacitation. *Anim. Reprod. Sci.*, v.116, p.38-49, 2009.

LEFIÉVRE, L., de LAMIRANDE, E., GAGNON, C. The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J. Androl.*, v.21, p.929-937, 2000.

MANUAL para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 1988. 49p.

MIRAGLIA, E., RULLO, M.L., BOSIA, A. et al. Stimulation of the nitric oxide/ cyclic guanosine monophosphate signaling pathway elicits human sperm chemotaxis *in vitro*. *Fertil. Steril.*, v.87, p.1059-1063, 2007.

MIRAGLIA, E., de ANGELIS, F., GAZZANO, E. et al. Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway. *Reproduction*, v.141, p.47-54, 2011.

MURAD, F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv. Pharm.*, v.26, p.19-33, 1994.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., WINER, M.A. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, v.38, p.1171-1180, 1988.

PARRISH, J.J., EID, L. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol. Reprod.*, v.51, p.1232-1237, 1994.

REVELLI, A., COSTAMAGNA, C., MOFFA, F. et al. Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v.64, p. 1708-1712, 2001.

RODRIGUEZ, P.C., O'FLAHERTY, C.M., BECONI, M.T., et al. Nitric oxide induces acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia* v.37, p.166-172, 2005.

SANTOS-SACCHI, J., GORDON, M. Induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa by cGMP analogues. *J. Cell Biol.*, v.85, p.798-803, 1980.

SENGOKU, K., TAMATE, K., YOSHIDA, T. et al. Effects of low concentration of nitric on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, v.69, p.522-527, 1998.

STEIN, D.M., FRASER, L.R. Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation *in vitro*. *Gamete Res.*, v.10, p.283-299, 1984.

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

WIESNER, B., WEINER, J., MIDDENDORFF, R. et al. Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{2+} entry into sperm. *J. Cell Biol.*, v.142, p.473-484, 1998.

6- ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA REVISTA REPRODUCTION

PAPEL DA VIA L-ARG/NO/GMP_c NA QUALIDADE ESPERMÁTICA DURANTE A CAPACITAÇÃO *IN VITRO* E O IMPACTO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRÕES BOVINOS

¹Leal, A.C.M.S.; ¹Caldas-Bussiere, M.C., ²Ohashi, O.M., ²Cordeiro, M.S., ¹Quirino, C. R.

¹Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil, 28013-602;

²Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal do Pará, Cidade Universitária, Belém, PA, Brazil, 66075-110

Corresponding author: Tel.: +55 22 2739 7285; Fax.:+55 22 27397194

E-mail address: claracal@uenf.br (M.C. Caldas-Bussiere)

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do óxido nítrico (NO), a via L-arg/NO/GMPc e mecanismos de ação na qualidade da capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos criopreservados, por meio da adição da L-arginina (L-arg, precursora da síntese de NO), 1*H*-(1,2,4) oxadiazolo-(4,3-*a*) quinoxalin-1-ona (ODQ, inibidor da guanilato ciclase solúvel, GCs) e 8-Br-GMPc (Br-GMPc, análogo do GMPc) e seu reflexo na produção *in vitro* de embriões. No experimento 01 foram avaliados a motilidade e o vigor pela microscopia, a integridade de membrana plasmática (MP), acrossomal (MA) e o potencial mitocondrial (PM) pela associação de 4 sondas fluorescentes (IP; hoescht; FITC-PSA e JC1) e a concentração de nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) pelo método de Griess após 4 h de capacitação. A adição de 1 mM de L-arg aumentou a síntese de NO (42,7%), a motilidade (10,2%), o vigor (15,4%) e a integridade de MP, MA e PM (43,4%) semelhante ao aumento obtido após a adição de 5 mM de Br-GMPc para todos os parâmetros avaliados ($P < 0,05$). A adição de 0,1 mM de ODQ diminuiu a síntese de NO (13,6%), a motilidade (55%), o vigor (34,6%) e a integridade de MP, MA e PM (84,4% - $P < 0,05$). No experimento 02, foi avaliada a peroxidação lipídica após a capacitação (4 h). A adição de 1 mM de L-arg e 5 mM de Br-GMPc diminuiu (27,7 e 34,3% respectivamente) a produção de hidroperóxido lipídico no espermatozoide ($P < 0,05$). No experimento 03 foram avaliados a capacitação e a reação acrossômica (RA) pelo teste de clortetraciclina (CTC). A adição de 1 e 10 mM de L-arg e 5 mM de Br-GMPc aumentou a capacitação (39,9; 10,1 e 26% respectivamente) e diminuiu a RA (37,6; 30,5 e 41,6% respectivamente - $P < 0,05$). A adição de ODQ (0,1 mM) diminuiu a capacitação (25,5%) e aumentou a RA (17,2% - $P < 0,05$). No experimento 04 a qualidade espermática foi avaliada pela taxa de produção de blastocistos *in vitro* utilizando espermatozoides pré-capacitados por 30 min com os mesmos tratamentos do experimento 02. A adição de 1 mM de L-arg melhorou todos os parâmetros avaliados no espermatozoide mas não aumentou a produção de blastocistos ($P > 0,05$). Contudo, o aumento foi obtido após a adição de 5 mM de Br-GMPc (15,7%). A adição de 0,1 mM de ODQ diminuiu (14,9%) a produção de blastocistos ($P < 0,05$). Esses resultados indicam que: 1) o NO está envolvido no controle da motilidade, vigor, integridade de MP, MA e PM, peroxidação lipídica, capacitação, RA e produção de blastocistos via NOS/NO/GMPc; 2) o NO está envolvido no controle da capacitação via GMPc; 3) o estado de atividade do GMPc regula a síntese de NO por retro-alimentação negativa; 4) a via L-arg/NO/GMPc está envolvida no controle da peroxidação lipídica modulando a produção de hidroperóxido lipídico no espermatozoide e peróxido de hidrogênio no meio de cultivo; 5) concentração ideal de NO durante a capacitação é necessária para a produção de embriões bovinos *in vitro* mas o NO não é o fator determinante e 6) a qualidade espermática sob a influência da via L-arg/NO/GMPc tem reflexo na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Palavras chave: óxido nítrico, espermatozoides, bovino, L-arginina, GMPc, ODQ

1- Introdução

A fertilização *in vitro* (FIV) é um dos grandes avanços alçado pela biotecnologia reprodutiva. No entanto, nos dias atuais ela ainda alcança limitações no desenvolvimento embrionário da produção *in vitro* de embriões – PIV. Problemas com o espermatozoide são responsáveis por 40% dos casos de infertilidade (Lejeune & Delvaux 2010) e o estresse oxidativo desempenha papel chave durante este evento (Lewis & Aikten 2005) por induzir fragmentação do DNA diminuindo o potencial fecundante do mesmo (Aikten *et al.* 1998). Chenoweth (2011) demonstrou que há um número limitado de mecanismos pelo qual a membrana do espermatozoide pode responder a efeitos deletério, contudo, diferenças no sucesso reprodutivo geralmente não são explicados pela avaliação seminal convencional.

O óxido nítrico (NO) é uma espécie de nitrogênio reativa, podendo atuar na sinalização inter e intracelular, como antioxidante ou radical livre (Dixit & Parvizi 2001). Ele é um gás incolor à temperatura e pressão ambiente, biologicamente ativo em quase todas as células do organismo, e se difunde livremente através das membranas, uma vez que tem um baixo peso molecular (Lowenstein *et al.* 1994).

Durante a conversão da L-arg em L-citrulina, o NO é produzido por reações oxidativas catalisadas pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Moncada & Higgs 1993). Existem três isoformas da NOS: duas constitutivas, dependentes de cálcio (NOS neuronal (nNOS); NOS endotelial (eNOS)), e uma induzível (iNOS), cálcio independente (Francavilla *et al.* 2000). Contudo, alguns trabalhos já relataram a expressão constitutiva para a iNOS em algumas células (Gath *et al.* 1996).

A localização e função de algumas isoformas da NOS têm sido descritas em espermatozoides bovinos (Meiser & Schulz 2003, O'Flaherty *et al.* 2004, Rodriguez *et al.* 2011), estando presentes no acrossoma e na cauda (O'Flaherty *et al.* 2004) atuando na motilidade, capacitação (Paes de Carvalho *et al.* 2003, Rodrigues *et al.* 2004, Leal *et al.* 2009, Ferreira-Berbari *et al.* 2010) e reação acrossômica (RA) (Rodrigues *et al.* 2004).

A capacitação espermática e a RA são eventos imprescindíveis para o sucesso da fertilização do oócito, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, dependendo da ação do NO, descritos em bovinos (Rodrigues *et al.* 2004, O'Flaherty *et al.* 2004, Ferreira-Berbari *et al.* 2007, 2010; Leal *et al.* 2009), suínos (Funahashi 2002) e bubalinos (Roy & Atreja 2008). O aumento de NO no meio de capacitação induz à RA em humanos

(Herrero *et al.* 2000); roedores (Guzman-Grenfell *et al.* 1999) e bovinos (O'Flaherty *et al.* 2004).

A utilização da L-arginina (L-arg, precursora da síntese de NO), no meio de capacitação, tem o objetivo de melhorar os parâmetros espermáticos para se alcançar maior eficiência na FIV e conseqüentemente na PIV, por aumentar a disponibilidade de NO no meio capacitante (Moncada *et al.* 1992, Leal *et al.* 2010). O'Flaherty *et al.* (2004) adicionaram L-arg (10, 20, 30, 40, 50 mM) no meio de cultivo e observaram que a adição de 10 mM melhorou a motilidade, a capacitação e a RA de espermatozoides bovinos após 45 min, avaliados pelo teste de clortetraciclina (CTC). Concentrações mais elevadas inibiram a motilidade.

Roy & Atreja (2008) verificaram que a adição de L-arg (15 e 20 mM) diminuiu a motilidade e a integridade da membrana, mas concentrações menores (5 e 10 mM) aumentaram a capacitação. Leal *et al.* (2009) observaram que após a adição de 10 mM de L-arg no meio de cultivo *in vitro* em bovinos, houve um aumento da motilidade a partir de 4 h, do vigor e da integridade de membrana a partir de 25 min de capacitação de espermatozoides *in natura*. Foi observado também um aumento da concentração de nitrato/ nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) no meio de capacitação, da atividade mitocondrial e da percentagem de oócitos penetrados após a adição de 10 mM de L-arg no meio capacitante.

O 1H-(1,2,4) oxadiazolo-(4,3-a)quinoxalin-1-ona (ODQ) é um inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs) enzima responsável pela ativação do GMPc solúvel (Garthwaite *et al.* 1995), principal via utilizada pelo NO na capacitação espermática. Ele tem sido utilizado juntamente com o 8-bromo-GMPc (Br-GMPc, análogo do GMPc) na busca do conhecimento da via e mecanismos de ação do NO. A adição de 50 μM de ODQ em espermatozoides de humanos, por 20 min, diminuiu a concentração intracelular de GMPc, enquanto que a adição de 1 mM de Br-GMPc aumentou, comparado com o controle (Miraglia *et al.* 2007). Santos-Sacchi e Gordon (1980) demonstraram que a adição de 10 mM de Br-GMPc no meio de capacitação por 1 h, aumentou a RA em cobaias.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos do óxido nítrico (NO), a via L-arg/NO/GMPc e mecanismos de ação na capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos criopreservados, por meio da adição da L-arg, ODQ e Br-GMPc e seu reflexo na produção *in vitro* de blastocisto.

2- Material e método

2.1. Meios de cultura e reagentes

Todos os reagentes utilizados foram da marca Sigma-Aldrick (St Louis, MO, USA), exceto os mencionados.

O meio-base utilizado na capacitação espermática foi o de Tyrode modificado (TALP-sp) (Parrish *et al.* 1988), suplementado com 6 mg/mL de BSA, livre de ácidos graxos, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

O meio de lavagem empregado na capacitação espermática foi o de Tyrodes, modificado segundo Chamberland *et al.* (2001).

Os meios foram esterilizados antes do uso por filtração, com unidades filtrantes estéreis de 0,22 µm (TPP – 99722 – Suíça), tendo passado por um período de 1 h de pré-incubação em estufa, a 38,5 °C, com atmosfera umidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ para estabilização. Após esse processo, foram armazenados à temperatura de 4 °C. A L-arginina (PM 174,2), o ODQ (PM 187,2) e o 8-bromo-GMPc (PM 446,1) foram diluídos e colocados no meio de capacitação quando os experimentos se iniciaram.

2.2. Preparação dos espermatozoides e capacitação

Foi utilizado sêmen comercial (Nova India Genética S/A, Uberaba, Brasil; CVR Lagoa, Sertãozinho, Brasil) criopreservado de 3 touros (*Bos indicus*) da raça Nelore, testados para FIV. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UENF) protocolo n° 49, validade 8/04/2013).

O sêmen foi submetido à centrifugação a 700 x g/10 min, em gradiente de Percoll (45 e 90%, Nutricell – São Paulo, Brasil) (Parrish & Eid 1994b), com o objetivo de separar os espermatozoides com maior viabilidade, para uso nos diferentes tratamentos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento formado foi lavado em 5 mL de meio de lavagem (Chamberland *et al.* 2001) e submetido à nova centrifugação a 200 x g/3 min. O sedimento resultante foi diluído com 200 µL de meio TALP-sp com heparina (TALP-sp), foi avaliada a motilidade, o vigor e, em seguida, foi calculada a concentração espermática.

A capacitação espermática *in vitro* foi induzida em 200 µL de meio de capacitação, acrescido de 20 µg/mL de heparina (T-H), em estufa a 38,5 °C com

atmosfera umidificada com 95% de ar e 5% de CO₂, por um período de 4 h (Parrish 1988). A concentração espermática foi ajustada para 5 x 10⁷ espermatozoides/mL.

2.3. Avaliação da qualidade espermática

2.3.1. Motilidade e vigor

A avaliação da motilidade progressiva e do vigor dos espermatozoides foi realizada de acordo com o *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*, do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

Para cada tratamento e após a capacitação (4 h), os espermatozoides foram avaliados de modo subjetivo, com o uso de microscópio de luz indireta, aumento 700x (ZEISS, Jenamed Germany, Suíça).

2.3.2. Integridade da membrana plasmática (Hoescht e iodeto de propídio - IP), acrossomal (PSA) e potencial mitocondrial (JC1)

Após o período de capacitação (4 h), uma aliquota de 50 µL de sêmen (25 x 10⁶ espermatozoide/mL) foi exposta ao Hoescht 33342 (40 µg/mL) e IP (0,5 mg/mL), JC1 (153 µg/mL), FITC-PSA (100 µg/mL) por 5 min para avaliação da integridade celular, mitocondrial e acrossomal respectivamente (Celeghini *et al.* 2007). Em seguida, uma amostra do sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula e os espermatozoides foram individualmente observadas no microscópio (NIKON - Eclipse TE300/TE200, Melville, N.Y., USA) (400 x). O IP se liga ao DNA de células com danos na membrana plasmática (Graham *et al.* 1990) corando o núcleo espermático em vermelho enquanto o hoescht se liga ao DNA de células integras corando o núcleo em azul (Casey *et al.* 1993). O FITC-PSA marca o dano no acrossoma espermático o corando em verde-amarelado (Graham *et al.* 1990). O JC-1 detecta mudanças no potencial de membrana esperático corando em verde a peça intermediária com baixo potencial mitocondrial e em vermelho, alto potencial mitocondrial (Gravance *et al.* 2000).

2.4. Dosagem de nitrato/nitrito (NO₃⁻/NO₂⁻)

A concentração de NO₃⁻/NO₂⁻ foi mensurada utilizando-se o método colorimétrico de Griess (Ricart-Jané *et al.* 2002). O reagente de Griess é composto de uma mistura de sulfanilamida 2% e N-(1-naphthyl) ethylene-diamine 0,2% em

água ultrapura. A primeira reação na amostra ocorre com o nitrito para formar o sal diazonium que reage com o segundo reagente para formar a cor púrpura com um pico de absorvância de 540 nm. Para reduzir o nitrato a nitrito as amostras (40 µL) foram incubadas com 40 µL de uma mistura contendo; 1000 µL da enzima nitrato redutase oriunda de bactéria (100 µL da enzima (10 UI) diluída em água ultrapura + 900 µl de água ultrapura), 1000 µl do cofator NADPH (5 mg/mL diluído em água ultrapura) e 1000 µL de tampão fosfato de potássio (0,5 M). As amostras foram incubadas a 38,5^o por 14-16 h. Posteriormente, 80 µL do reagente de Griess foram adicionadas às amostras.

O método foi realizado em placa de 96 poços. Todas as soluções foram protegidas da luz. Uma curva padrão de nitrito de sódio diluída em meio TALP contendo valores conhecidos de nitrito foi utilizada, onde o valor mínimo de nitrito foi de 1 µM e o máximo de 400 µM. Com os valores da absorvância foi montado um gráfico de dispersão. Após fazer a relação entre a absorvância e concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, foi traçada uma curva indicando sua correlação.

2.5. Avaliação da peroxidação lipídica

Foram determinados os peróxidos lipídicos da célula e os peróxidos de hidrogênio no meio aquosos (Kit PeroxiDetectTM – PD1). Os peróxidos reduzem o íon férrico (Fe^{2+}) para ferroso (Fe^{3+}) em condições ácidas. Os íons Fe^{3+} se ligam ao laranja de xilenol (XO) dando uma coloração laranja, observada no espectrofotômetro a 560 nm. Foi utilizada uma curva padrão de peróxido de hidrogênio e outra de peróxido lipídico, contendo valores conhecidos, onde o valor mínimo foi de 1 nmol para ambos e o máximo foi de 8 nmols para o peróxido de hidrogênio (100 µM) e 16 nmols para o peróxido lipídico (200 µM). Com os valores da absorvância foi montado um gráfico de dispersão. Após fazer a relação entre a absorvância e concentração dos peróxidos, foi traçado uma curva indicando sua correlação.

2.6. Avaliação da capacitação pelo teste da clortetraciclina fluorescente (CTC)

A capacitação foi avaliada usando a coloração de clortetraciclina (CTC), como descrito por Cormier *et al.* (1997), com algumas modificações. A solução estoque de CTC (0,75 mM CTC, 20 mM tris-base e 5 mM DL-cysteine) foi preparada diariamente. Foram adicionados 15 µL da solução final de CTC [300 µL de solução estoque de CTC misturado com 10 µL de paraformoldeído (4%) em 20 mM de tris-

base e 60 µL de 0,22 M de 1,4 diazabicyclo octane - DABCO (Invitrogen Molecular Probe, Eugene, OR, USA)] a 15 µL de espermatozoide (25×10^6 espermatozoide/mL). Logo a seguir, 5 µL dessa suspensão corada foi colocada entre lâmina e laminula e observada no microscópio de epifluorescência - NIKON (Eclipse TE300, Melville, NY, USA; 40x - excitação de 440 nm e emissão de 470 nm). Um total de 200 espermatozoides foram contados e classificados em 3 grupos, como descrito por Fraser *et al.* (1995): F (fluorescente), espermatozoide intacto e não capacitado, fluorescendo toda sua superfície; C (capcitado) espermatozoide capacitado intacto, perda da fluorescência na região pós acrossomal e RA, espermatozoide com o acrossoma reagido, perda da fluorescência na região pós acrossomal e acrossomal, expressando fluorescência apenas na peça intermediária.

2.7. Avaliação da qualidade da capacitação espermática pela fertilização *in vitro* (FIV) utilizando oócitos homólogos até a formação de blastocistos

2.7.1. Seleção e maturação dos oócitos *in vitro*

Foram selecionados os complexos cumulus oophorous (CCOs) com graus 1 e 2 (figura 01a), de acordo com a classificação de qualidade relatada por de Loos *et al.* (1989), a partir de ovários obtidos de matadouro. Os ovários foram coletados logo após o abate, lavados, acondicionados em solução salina (0,9% de cloreto de sódio) e transportados até o laboratório dentro de um período máximo de 3 h. Após a seleção (figura 01b), os oócitos foram lavados 3 a 4 vezes em meio de cultura de tecidos (TCM) 199 com HEPES, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,22 mM de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina e posteriormente transferidos para o meio de maturação.

O meio utilizado para maturação *in vitro* (MIV) foi o meio 199 acrescido de 10% de SFB, 0,5 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 22 µg/mL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina. A maturação foi realizada em placas de Petri de poliestireno (35x10 mm, Corning Inc. Acton, MA, USA) em gotas de 100 µL de meio MIV (10 oócitos), sob óleo mineral esteril, em estufa a 38,5^o C, de 5% de CO₂, 20% de O₂ e 75% de N₂, durante 18 h (figura 01c).

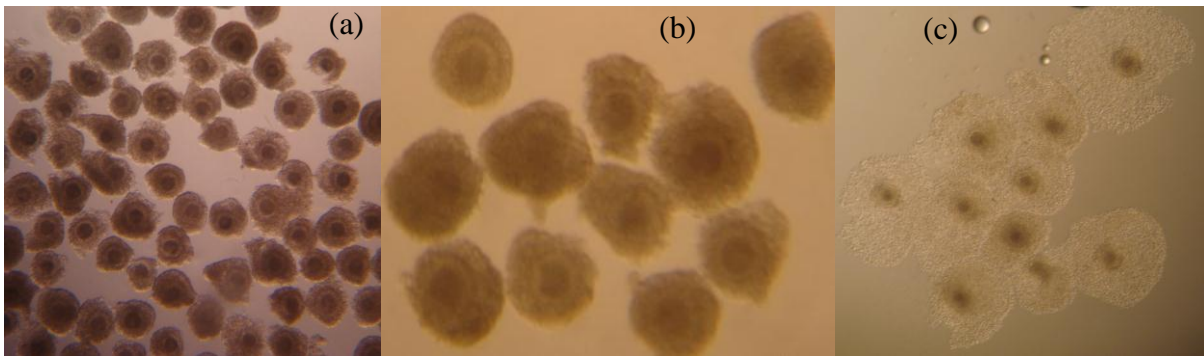


Figura 01- (a) seleção de oócitos de grau 1 e 2, (b) oócitos imaturados, (c) oócitos maturados após 18 h de MIV.

2.7.2. Fertilização *in vitro* (FIV)

Os espermatozoides previamente capacitados por 30' em meio Talp acrescido de diferentes tratamentos (1 e 10 mM de L-arg; 0,1 mM de ODQ; 1 mM de L-arg + 0,1 mM de ODQ; 5 mM de GMPc e 5 mM de GMPc + 0,1 mM de ODQ) foram lavados em TALP-sp suplementado com 10% de BSA para remoção dos tratamentos. A dose inseminante foi fixada em $1,6 \times 10^6$ espermatozoides/mL.

Após a MIV (18 h), os espermatozoides foram co-incubados, durante 27 h, a $38,5^{\circ}$ C, de 5% de CO_2 , 20% de O_2 e 75% de N_2 , juntamente com os oócitos (20 por gota de 80 μL) em meio TALP, acrescido de 6 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina, 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (TALP-fecundação), segundo Parrish *et al.* (1988).

2.7.3. Cultivo *in vitro* (CIV)

Foi utilizado um sistema de co-cultivo de embriões com monocamada de células do *cumulus oophorus* que aderem à placa durante a MIV. Para isso, logo após o início da FIV, o meio da placa de MIV foi substituído por 100 μL de meio de cultivo embrionário (SOF), a qual permaneceu incubada até o momento de transferência do embrião (27 h de FIV).

Após 27 a 30 h do início da FIV, os possíveis zigotos foram submetidos a uma sequência de pipetagem para a retirada das células do *cumulus oophorus* restantes e dos espermatozoides aderidos à zona pelúcida. A seguir, foram transferidos para as gotas de CIV (20 possíveis zigotos para cada gota de 100 μL de meio SOF)

totalmente desnudos. O meio de cultivo foi suplementado com 10% de SFB, 6 mg/mL BSA e 50 µg/mL de gentamicina.

2.7.4. Avaliação do desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário foi avaliado com auxílio de um estereomicroscópio, de acordo com a taxa de clivagem (figura 02a) e blastocisto (figura 02b) (segundo e sétimo dia de cultivo *in vitro*, respectivamente), segundo o *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões – IETS* (Stringfellow & Seidel 1999).

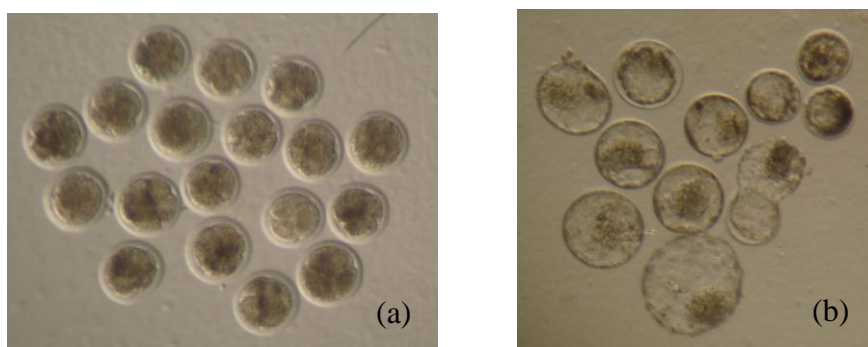


Figura 02- (a) oócitos clivados D2, (b) blastocistos em D7. Ambos cultivados em gotas de 100 µL de meio CIV contendo 20 oócitos.

2.8. Experimentos

2.8.1. Experimento I: Avaliação do papel da L-arginina, ODQ e Br-GMPc na viabilidade dos espermatozoides após a capacitação

Foi avaliado o efeito da adição de diferentes concentrações de L-arg (1; 2,5; 5; 10 e 50 mM); 0,1 mM de ODQ; 0,1 mM de ODQ associada a 1 mM L-arg (concentração que apresentou melhores resultados na motilidade e vigor); 5 e 10 mM do Br-GMPc (concentrações que apresentaram melhores resultados após experimentos prévios na avaliação da motilidade, vigor e capacitação espermática) e 5 e 10 mM do Br-GMPc associados a 0,1 mM de ODQ, no meio de capacitação espermática *in vitro* com heparina (T-H) após a capacitação (4 h). O controle consistiu de espermatozoides capacitados em meio de capacitação com heparina. Os seguintes parâmetros foram analisados: motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática, acrossomal e o potencial mitocondrial. O experimento foi

concluído com 6 repetições e o sobrenadante dos meios foram armazenados a -20 °C para posterior dosagem de nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$).

2.8.2. Experimento II: Avaliação do mecanismo de ação da L-arg/NO

2.8.2.1. Peroxidação lipídica

Foi utilizado um *kit* comercial (PeroxiDetect™ – PD1) após a adição de L-arg (1 e 10 mM – melhor e pior concentração de acordo com o experimento 1); ODQ (0,1 mM); 0,1 mM de ODQ associada a 1 mM de L-arg; 5 e 10 mM do Br-GMPc e 5 e 10 mM do Br-GMPc associada a 0,1 mM de ODQ, no meio de capacitação espermática *in vitro* com heparina (T-H) após a capacitação (4 h). O experimento foi concluído com 6 repetições. O controle consistiu de espermatozoides capacitados em T-H.

2.8.3. Experimento III: Avaliação da capacitação pelo teste da clortetraciclina fluorescente (CTC)

Foi avaliado o efeito da adição de L-arg (1 e 10 mM – melhor e pior concentração de acordo com o experimento 1); 0,1 mM de ODQ; 0,1 mM de ODQ associada a 1 mM L-arg; 5 e 10 mM do Br-GMPc e 5 e 10 mM do Br-GMPc associados a 0,1 mM ODQ, no meio de capacitação espermática *in vitro* com heparina (T-H), após a capacitação (4 h). O controle consistiu de espermatozoides capacitados em meio de capacitação com heparina. O experimento foi concluído com 6 repetições.

2.8.4. Experimento IV: Avaliação da qualidade da capacitação espermática *in vitro* pela taxa de produção de blastocistos

A qualidade espermática foi avaliada pela produção de blastocistos após prévia capacitação *in vitro* (30 min) em T-H, tendo adicionado 1 e 10 mM de L-arg; 0,1 mM de ODQ; 0,1 mM de ODQ associada a 1 mM L-arg; 5 mM do Br-GMPc e 5 mM do Br-GMPc associada a 0,1 mM ODQ. O experimento foi concluído com 6 repetições. O controle consistiu de espermatozoides capacitados em T-H (30 min) e do controle imediato (espermatozoides não capacitados previamente). Foram feitos experimentos prévios com a adição de 10 mM de GMPc no meio de FIV, para a produção de blastocistos no entanto, a produção foi baixa, não justificando seu uso.

2.9. Análise estatística

Após a coleta dos dados, estes foram submetidos ao programa SAS (Statistical Analysis System, 1996).

Os resultados referentes à motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática, acrossomal, potencial mitocondrial, dosagem de NO, peroxidação lipídica, teste de clortetraciclina e a formação de blastocisto foram submetidos à análise de variância (PROC GLM) para verificar os efeitos de concentração e dos animais sobre as características estudadas e as médias comparadas pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

3- Resultados

3.1. Experimento I: Ação da L-arginina, ODQ e Br-GMPc na viabilidade dos espermatozoides após a capacitação

3.1.1. Avaliação da motilidade

A análise de variância mostrou que houve efeito significativo ($P < 0,05$) na motilidade para os tratamentos após a capacitação (4 h) (figura 03).

Houve um efeito dose resposta na motilidade após a adição de diferentes concentrações de L-arg no meio de capacitação, quando comparados com o controle ($P < 0,05$). A adição de 1 mM L-arg aumentou a motilidade comparado com o controle (10,2%) e 5; 10 e 50 mM de L-arg (21,3; 76,4; 135,7%, respectivamente - $P < 0,05$). A adição de 0,1 mM ODQ diminuiu a motilidade quando comparado ao controle (55%) e 1; 2,5; 5 e 10 mM L-arg (59,2; 57; 50,5; 28%, respectivamente - $P < 0,05$). A adição de 1 mM de L-arg à 0,1 mM de ODQ, no meio de capacitação, impediu parcialmente (26,5%) o efeito inibitório do ODQ (figura 03 - $P < 0,05$).

A adição de 5 mM de Br-GMPc aumentou a motilidade comparado com o controle (13,9%), contudo, não houve diferença ($P > 0,05$) quando foi adicionado 10 mM de Br-GMPc. A associação de 5 mM de Br-GMPc à 0,1 mM de ODQ, impediu o efeito inibitório do ODQ, enquanto a adição de 10 mM de Br-GMPc à 0,1 mM de ODQ impediu parcialmente (46%) o efeito inibitório (figura 03 - $P < 0,05$). No entanto, a adição de 1 mM de L-arg, 5 e 10 mM de Br-GMPc não diferiram entre si ($P > 0,05$).

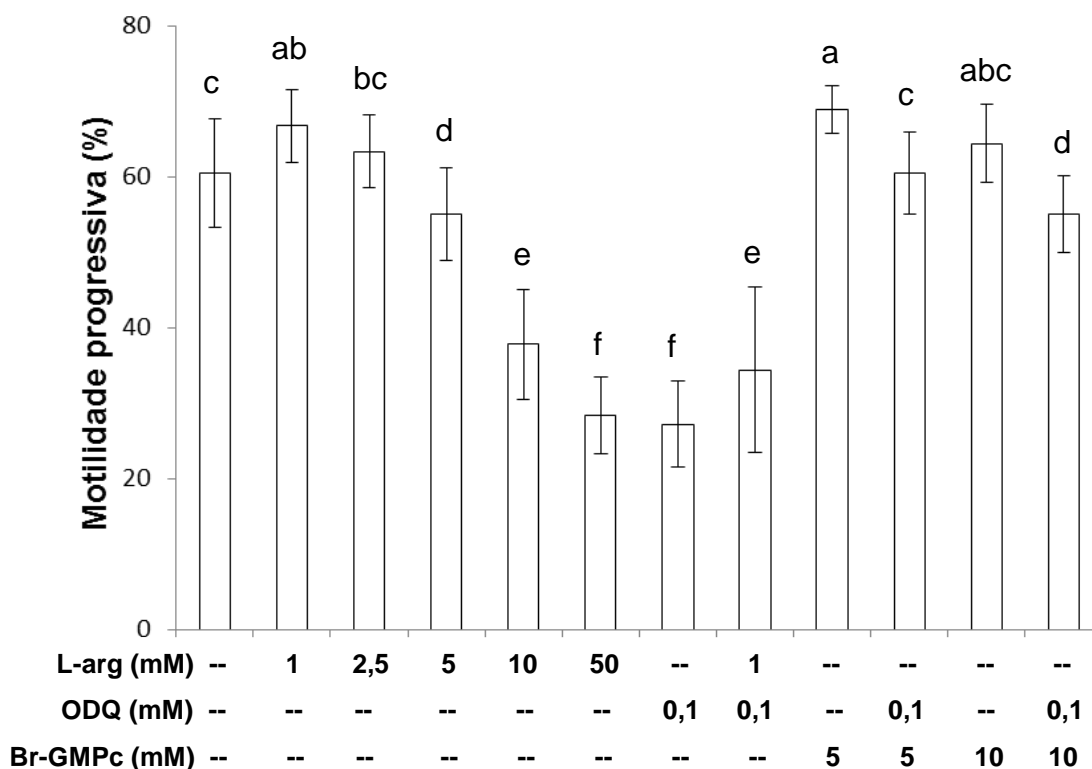


Figura 03- Motilidade progressiva de espermatozoides bovinos de 3 touros, tratados com diferentes concentrações de L-arg, ODQ e Br-GMPc após a capacitação *in vitro* (4 h). Diferentes letras sobre as barras indicam diferenças ($P < 0,05$). Dados são apresentados como médias \pm DP de 6 replicatas.

3.1.2- Avaliação do vigor

A análise de variância mostrou que houve efeito significativo ($P < 0,05$) na avaliação do vigor para os tratamentos, após a capacitação (4 h) (figura 04).

Houve um efeito dose resposta no vigor após a adição de diferentes concentrações de L-arg, no meio de capacitação, quando comparado com o controle ($P < 0,05$). A adição de 1 mM L-arg aumentou o vigor comparado com o controle (15,4%) e 2,5; 5; 10 e 50 mM de L-arg (25; 42,8; 50; 57,9%, respectivamente - $P < 0,05$). No entanto, a adição de 5, 10 e 50 mM de L-arg não diferiram entre si ($P > 0,05$). A adição de 0,1 mM ODQ diminuiu o vigor comparado com o controle (34,6%) e 1; 2,5 e 5 mM L-arg (43,3; 29,2; 19%, respectivamente - $P < 0,05$). A adição 1 mM de L-arg à 0,1 mM de ODQ, não impediu o efeito inibitório do ODQ (figura 04 - $P > 0,05$).

A adição de 5 mM de Br-GMPc aumentou o vigor comparado com o controle (19,2%), contudo, não houve diferença ($P>0,05$) quando foi adicionado 10 mM de Br-GMPc. A associação de 5 mM de Br-GMPc à 0,1 mM de ODQ, impediu o efeito inibitório do ODQ, enquanto que a adição de 10 mM de Br-GMPc à 0,1 mM de ODQ impediu parcialmente (19,2%) este efeito (figura 04 - $P<0,05$). No entanto, a adição de 1 mM de L-arg, 5 e 10 mM de Br-GMPc não diferiram entre si ($P>0,05$).

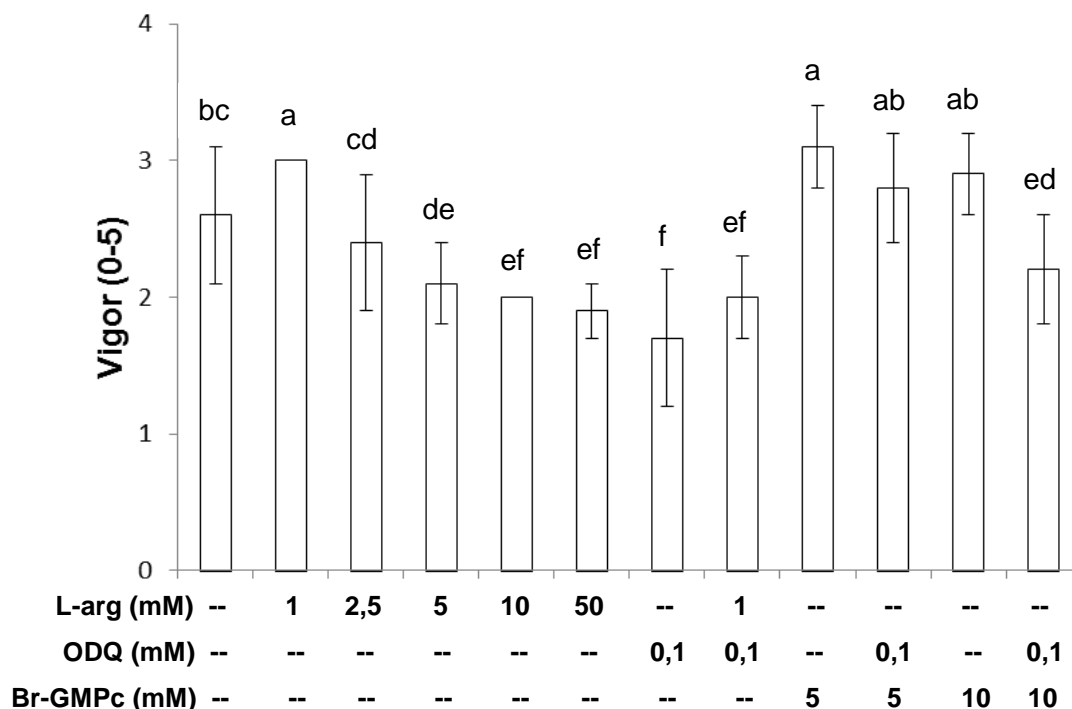


Figura 04- Vigor de espermatozoides bovinos de 3 touros, tratados com diferentes concentrações de L-arg, ODQ e Br-GMPc após a capacitação *in vitro* (4 h). Diferentes letras sobre barras indicam diferenças ($P<0,05$). Dados são apresentados como médias \pm DP de 6 replicatas.

3.1.3- Avaliação da integridade da membrana plasmática (MP), acrossomal (MA) e potencial mitocondrial (PM)

A análise de variância mostrou que houve efeito significativo ($P<0,05$) na avaliação da integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial para os tratamentos, após a capacitação (4 h) (tabela 01).

Houve um efeito dose resposta na integridade de membrana plasmática, acrossomal e no potencial mitocondrial após a adição de diferentes concentrações de L-arg, no meio de capacitação, quando comparados com o controle ($P<0,05$). A

adição de 1 mM de L-arg aumentou a integridade de MP, MA e o PM comparado com o controle (43,4%) e 2,5; 5; 10 e 50 mM de L-arg (12,9; 47,6; 189,2; 372,9% respectivamente – tabela 01 - $P < 0,05$).

A adição de 0,1 mM ODQ aumentou a porcentagem de células com MP e MA lesadas e baixo PM comparado com o controle (122,6%) e 1; 2,5; 5; 10 e 50 mM de L-arg (163,7; 150,5; 91,2; 69,2; 23,4% respectivamente - $P < 0,05$). A adição de 1 mM de L-arg à 0,1 mM de ODQ, protegeu parcialmente (51,1%) a lesão de MP, MA e diminuição do PM causada pelo ODQ (tabela 01 - $P < 0,05$).

A adição de 10 mM de Br-GMPc aumentou a integridade de MP, MA e o PM comparado com o controle (56,1%) e 5 mM de Br-GMPc (4,7% - $P < 0,05$). A associação 5 ou 10 mM de Br-GMPc à 0,1 mM de ODQ, impediram o efeito inibitório do ODQ ($P < 0,05$). No entanto, a adição de 5 mM de Br-GMPc não diferiu de 1 mM de L-arg ($P > 0,05$ – tabela 01).

3.1.4- Concentração NO_3^-/NO_2^- no meio de capacitação

A análise de variância mostrou que houve efeito significativo ($P < 0,05$), na dosagem de NO_3^-/NO_2^- para os tratamentos, após a capacitação (4 h) (figura 05).

Houve um efeito dose resposta na concentração de nitrato/nitrito após a adição de diferentes concentrações de L-arg no meio de capacitação, quando comparados com o controle ($P < 0,05$). A adição de 0,1 mM ODQ diminuiu (13,6%) a concentração de nitrato + nitrito quando comparado ao controle (figura 05c) devido à inibição do nitrito (figura 06b - $P < 0,05$). A adição de 1 mM de L-arg à 0,1 mM de ODQ no meio de capacitação, impediu o efeito inibitório do ODQ tanto na síntese de nitrato (figura 06a) como de nitrito (figura 05b), apresentando concentrações mais elevadas do que o controle (25,5%) ao analisarmos o total, nitrato + nitrito (figura 05c - $P < 0,05$).

A adição de 5 e 10 mM de Br-GMPc no meio de capacitação aumentou a concentração de nitrato (33,9 e 291,7%, respectivamente) e de nitrito (24 e 342,8%, respectivamente) comparado com o controle (figura 05a,b), tendo-se observado um aumento muito maior após a adição do 10 mM de Br-GMPc ($P < 0,05$). A adição 5 e 10 mM de Br-GMPc à 0,1 mM de ODQ impediu o efeito inibitório do ODQ, tendo sido observado um aumento na produção de nitrato (283,5%) e nitrito (308,4%) após a adição de 10 mM de Br-GMPc à 0,1 mM de ODQ comparado com o controle (figura 06a,b - $P < 0,05$). Contudo, a adição de 10 mM de Br-GMPc não diferiu de 50 mM de L-arg ao observar a produção de nitrato + nitrito (figura 05c - $P > 0,05$).

Tabela 01- Ação de diferentes concentrações de L-arginina (L-arg), de ODQ e de Br-GMPc na integridade de membrana plasmática (MP), acrossomal (MA) e potencial mitocondrial (PM) (%) de espermatozoides bovinos criopreservados após a capacitação *in vitro* (4h) avaliados com probes fluorescentes FITC-PSA, IP, Hoesch e JC1.

Tratamento	Classificação da integridade de membranas e potencial mitocondrial (%)							
	MP e MA intactas e ↑ PM	MP e MA intactas e ↓ PM	MP lesada, MA intacta e ↑ PM	MP lesada, MA intactas e ↓ PM	MP intacta, MA lesada e ↑ PM	MP intacta, MA lesada e ↓ PM	MP lesada, MA lesada e ↑ PM	MP e MA lesadas e ↓ PM
Controle	24,4±2,3 ^{DEa}	7,0±1,6 ^{Cef}	2,7±0,9 ^{ABg}	16,6±3,1 ^{Ec}	5,8±1,7 ^{Cf}	8,4±1,8 ^{Ae}	12,5±1,8 ^{Cd}	22,5±1,7 ^{Fb}
1 mM L-arg	35,0±3,4 ^{Ba}	5,9±1,5 ^{Dd}	1,5±1,7 ^{CDe}	12,2±2,5 ^{Fc}	7,7±2,2 ^{Bd}	6,8±1,8 ^{Bd}	12,2±2,0 ^{Cc}	19,0±2,0 ^{Gb}
2,5 mM L-arg	31,0±2,7 ^{Ca}	1,8±1,1 ^{EFF}	2,0±1,1 ^{BCF}	26,9±2,9 ^{Cb}	5,9±1,9 ^{Ce}	2,0±1,4 ^{Df}	1,4±1,8 ^{Dd}	20,0±1,4 ^{Gc}
5 mM L-arg	23,7±2,4 ^{Ec}	1,8±1,5 ^{EFF}	2,0±1,5 ^{BCF}	27,5±2,2 ^{Ca}	6,7±1,7 ^{BCe}	2,1±1,6 ^{Df}	9,4±2,1 ^{DEd}	26,2±1,7 ^{Eb}
10 mM L-arg	12,1±2,0 ^{Fc}	5,9±1,4 ^{Dd}	1,8±1,3 ^{BCDf}	28,5±2,1 ^{Ca}	1,6±1,5 ^{DEf}	4,5±1,6 ^{Ce}	15,4±2,3 ^{Bb}	29,6±2,0 ^{Da}
50 mM L-arg	7,4±1,9 ^{Gb}	2,4±1,6 ^{Ed}	0,6±0,6 ^{De}	41,2±3,2 ^{Aa}	1,2±1,2 ^{DEde}	2,3±1,3 ^{Dd}	4,3±1,3 ^{FGc}	40,6±3,0 ^{Ba}
0,1 mM ODQ	3,8±1,6 ^{Hd}	9,2±1,7 ^{Bc}	1,2±1,2 ^{CDe}	23,3±2,4 ^{Db}	2,3±1,5 ^{DEe}	3,8±1,8 ^{Cd}	5,0±1,1 ^{Fd}	50,1±2,8 ^{Aa}
0,1 mM ODQ + 1 mM L-arg	8,3±2,0 ^{Gd}	11,2±1,8 ^{Ac}	1,4±1,0 ^{CDf}	35,3±2,0 ^{Bb}	0,9±0,8 ^{Ef}	1,1±0,8 ^{DEf}	2,8±1,2 ^{Ge}	38,6±2,4 ^{Ca}
5 mM Br-GMPc	36,4±3,4 ^{Ba}	0,7±0,9 ^{Fe}	1,5±1,5 ^{CDe}	26,6±2,5 ^{Cb}	7,9±2,8 ^{Be}	0,7±0,9 ^{Ef}	8,0±1,6 ^{Ed}	18,0±3,8 ^{Gc}
5 mM Br-GMPc + 0,1 mM ODQ	26,1±3,1 ^{Da}	0,9±1,1 ^{Fe}	1,1±1,2 ^{CDe}	13,5±2,2 ^{Fc}	9,6±1,9 ^{Ad}	1,2±1,4 ^{DEe}	26,3±5,8 ^{Aa}	20,0±3,4 ^{Gb}
10 mM Br-GMPc	38,1±2,8 ^{Aa}	2,0±1,3 ^{EFe}	3,5±1,2 ^{Ae}	26,9±2,9 ^{Cb}	2,6±1,4 ^{De}	0,2±0,5 ^{Ef}	8,0±2,1 ^{Ed}	18,5±2,2 ^{Gc}
10 mM Br-GMPc + 0,1 mM ODQ	26,1±2,1 ^{Da}	0,8±1,1 ^{Fe}	1,0±1,3 ^{CDe}	16,4±2,2 ^{Ec}	9,4±1,6 ^{Ad}	1,1±1,0 ^{DEe}	25,9±2,7 ^{Aa}	19,2±2,1 ^{Gb}

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças, para cada tipo de classificação da integridade de membranas, entre tratamentos (P<0,05).

Médias seguidas de letras distintas minúsculas na mesma linha indicam diferenças, para cada tratamento, entre tipos de classificações da integridade de membranas (P<0,05).

Dados são apresentados como média ± DP de seis replicatas.

IP – cora o núcleo da célula em vermelho – MP lesada; Hoesch – cora o núcleo da célula em azul – MP integra; FITC-PSA – cora região do acrossoma em verde - MA lesada; JC1 – cora peça intermediária em vermelho - ↑ potencial mitocondrial; JC1 – cora peça intermediária em verde - ↓ potencial mitocondrial.

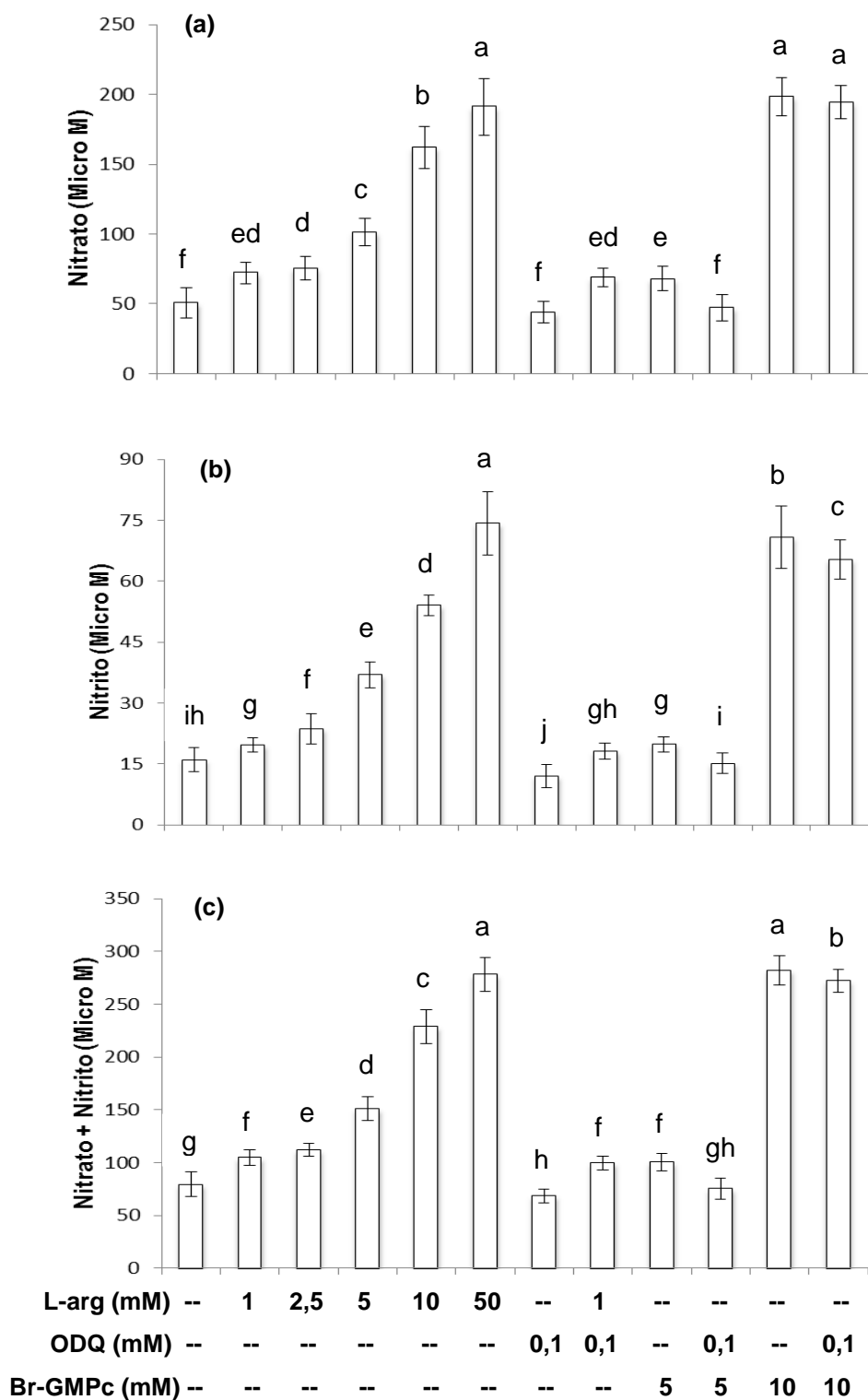


Figura 05- Concentração de nitrato/ nitrito no meio de capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos de 3 touros, tratados com diferentes concentrações de L-arg, ODQ e Br-GMPc após a capacitação (4 h). (a) concentração de nitrato, (b) concentração de nitrito e (c) concentração de nitrato+nitrito. Diferentes letras sobre barras indicam diferenças ($P < 0,05$). Dados são apresentados como médias \pm DP de 6 replicatas.

3.2. Experimento II: Ação da L-arg/ NO na integridade de membrana espermática

3.2.1. Avaliação da Peroxidação lipídica

A análise de variância mostrou que houve efeito significativo ($P < 0,05$) na concentração de hidroperóxido lipídico (HL) no espermatozoide (figura 06a) e peróxido de hidrogênio (PH) no meio de cultivo (figura 06b) para os tratamentos, após a capacitação (4 h).

A adição 1 mM de L-arg, 0,1 mM de ODQ e 5mM de Br-GMPc no meio de capacitação diminuiu (27,7; 26,9 e 34,3%, respectivamente) a concentração de HL no espermatozoide comparado com o controle ($P < 0,05$), contudo, não houve diferença entre eles ($P > 0,05$; figura 06a).

A adição de 5 mM de GMPc diminuiu (10,4%) a produção de PH no meio de capacitação (figura 06b) comparado com o controle ($P < 0,05$; figura 06b).

3.3. Experimento III: Avaliação da capacitação pelo teste da clortetraciclina fluorescente (CTC)

A análise de variância mostrou que houve efeito significativo ($P < 0,05$) na avaliação pelo CTC, para os tratamentos após a capacitação (4 h) (figura 07).

A adição de 1 e 10 mM de L-arg no meio de capacitação aumentou (39,9 e 10,1% respectivamente) a percentagem de espermatozoides capacitados e diminuiu (37,6 e 30,5% respectivamente) a percentagem de espermatozoide com o acrossoma reagido, quando comparado com o controle (figura 07 - $P < 0,05$).

A adição de 0,1 mM ODQ diminuiu a porcentagem de espermatozoides capacitados quando comparado com o controle (25,5%) e 1 e 10 mM de L-arg (46,8% e 32,4% respectivamente), porém, aumentou a porcentagem de espermatozoides reagidos (17,2%) e não capacitados (18,1%) quando comparado com o controle ($P < 0,05$). A associação de 1 mM de L-arg à 0,1 mM de ODQ no meio de capacitação, impediu o efeito inibitório do ODQ sobre a percentagem de espermatozoides capacitados, aumentando (12,2%) inclusive a capacitação comparado com o controle e diminuindo (19,7%) a RA (figura 07 - $P < 0,05$).

A adição de 5 mM de Br-GMPc aumentou a porcentagem de espermatozoides capacitados e diminuiu a porcentagem de espermatozoides reagidos quando comparado com o controle (26 e 41,6% respectivamente) e 10 mM L-arg (14,4 e 16% respectivamente - $P < 0,05$). A adição de 5 mM de Br-GMPc à 0,1 mM de ODQ

impediu parcialmente (19,6%) o efeito inibitório do ODQ na capacitação porém diminuiu (33,6%) a RA e aumentou (7,4%) a percentagem de espermatozoides não capacitados ($P < 0,05$).

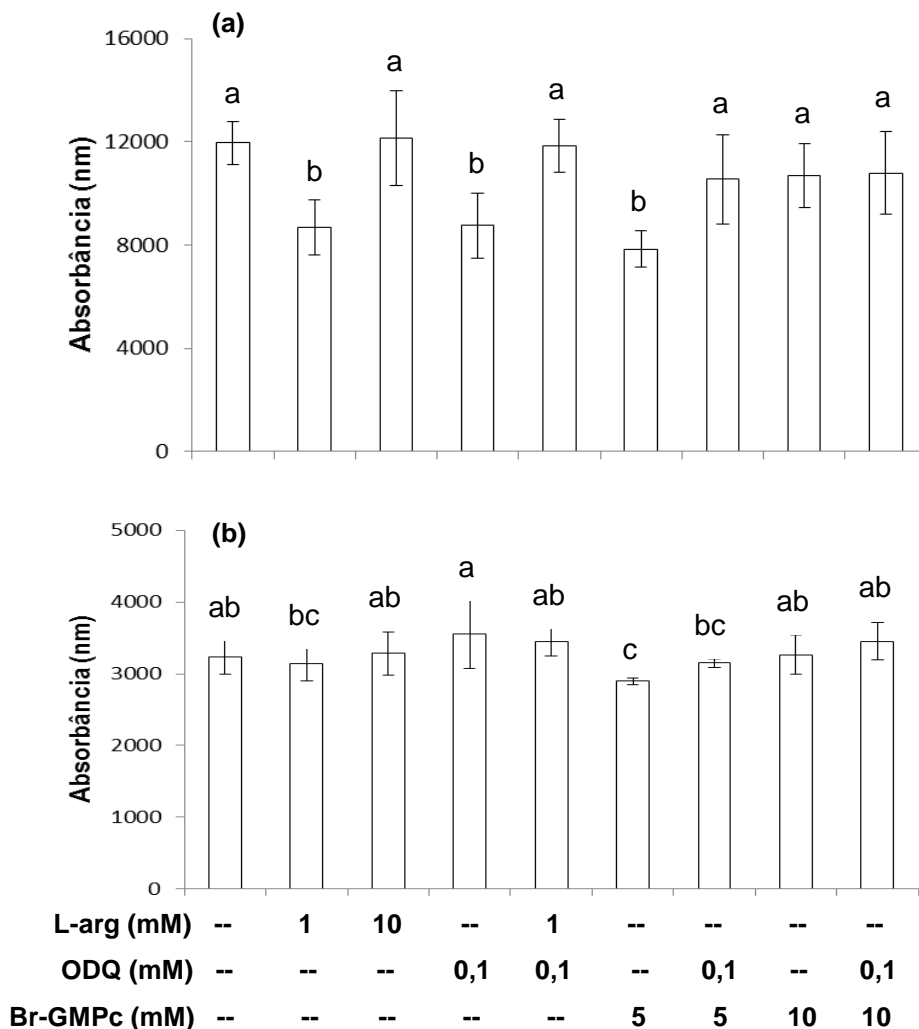


Figura 06- (a) Concentração de hidroperóxido lipídico (HL-ROO*) no espermatozoide, (b) peróxido de hidrogênio (PH-H₂O₂) no meio de cultivo após a capacitação (4 h) *in vitro* de espermatozoides bovinos de 3 touros, tratados com diferentes concentrações de L-arg, ODQ e Br-GMPc. Diferentes letras sobre barras indicam diferenças ($P < 0,05$). Dados são apresentados como médias \pm DP de 6 replicatas.

A adição de 10 mM Br-GMPc diminuiu (32%) a percentagem de células capacitadas e aumentou (60,2%) a percentagem de espermatozoides reagidos comparado com o controle. A associação de 10 mM de Br-GMPc à 0,1 mM de ODQ não impediu o efeito inibitório do ODQ, ao contrário, diminuiu ainda mais a

capacitação (24,8%), a percentagem de espermatozoides com o acrossoma reagido (21,1%) e aumentou a percentagem de espermatozoides não capacitados (46,9% - $P < 0,05$).

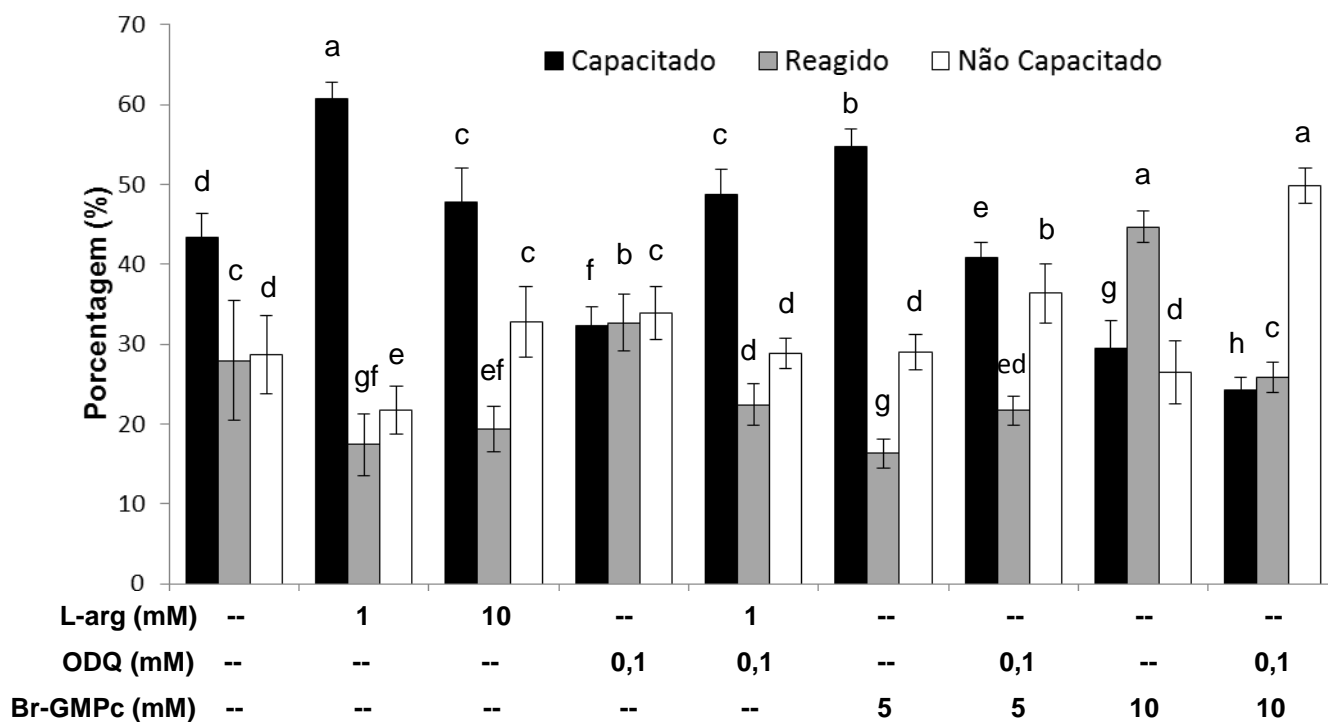


Figura 07- Percentagem de espermatozoide bovino (n=3) capacitado, reagido e não capacitado, após serem tratados com diferentes concentrações de L-arg, ODQ e Br-GMPc por 4 h de capacitação *in vitro*. Diferentes letras sobre barras indicam diferenças ($P < 0,05$), n=6.

3.4. Experimento IV: Papel do NO na capacitação espermática *in vitro* avaliada pela produção de blastocistos

A análise de variância mostrou que houve efeito significativo ($P < 0,05$) na produção *in vitro* de embriões (PIV), para os tratamentos, após a capacitação (30 min) (figura 08).

A incubação prévia dos espermatozoides em meio capacitante por 30 min (controle 30 min) não alterou a produção PIV de embriões quando comparado com o controle imediato (espermatozoides sem prévia incubação) (figura 08 - $P > 0,05$).

A adição de 1 mM de L-arg no meio de capacitação não alterou a produção *in vitro* de embriões comparado com o controle imediato e controle 30 min ($P > 0,05$). Contudo, a adição de 10 mM de L-arg diminuiu essa produção (20,2% - $P < 0,05$).

A adição de 0,1 mM de ODQ diminuiu a produção de blastocistos comparado com o controle imediato (14,9%), controle 30 min (17,5%) e 1 mM de L-arg (19,1% - $P < 0,05$). A associação de 1 mM de L-arg à 0,1 mM de ODQ não impediu o efeito inibitório do ODQ na produção *in vitro* de embriões ($P > 0,05$).

A adição de 5 mM de Br-GMPc no meio de capacitação aumentou a produção de blastocistos comparado com o controle imediato (15,7%) e controle 30 min (12,1% - $P < 0,05$). A associação de 5 mM de GMPc à 0,1 mM de ODQ impediu o efeito inibitório do ODQ ($P < 0,05$).

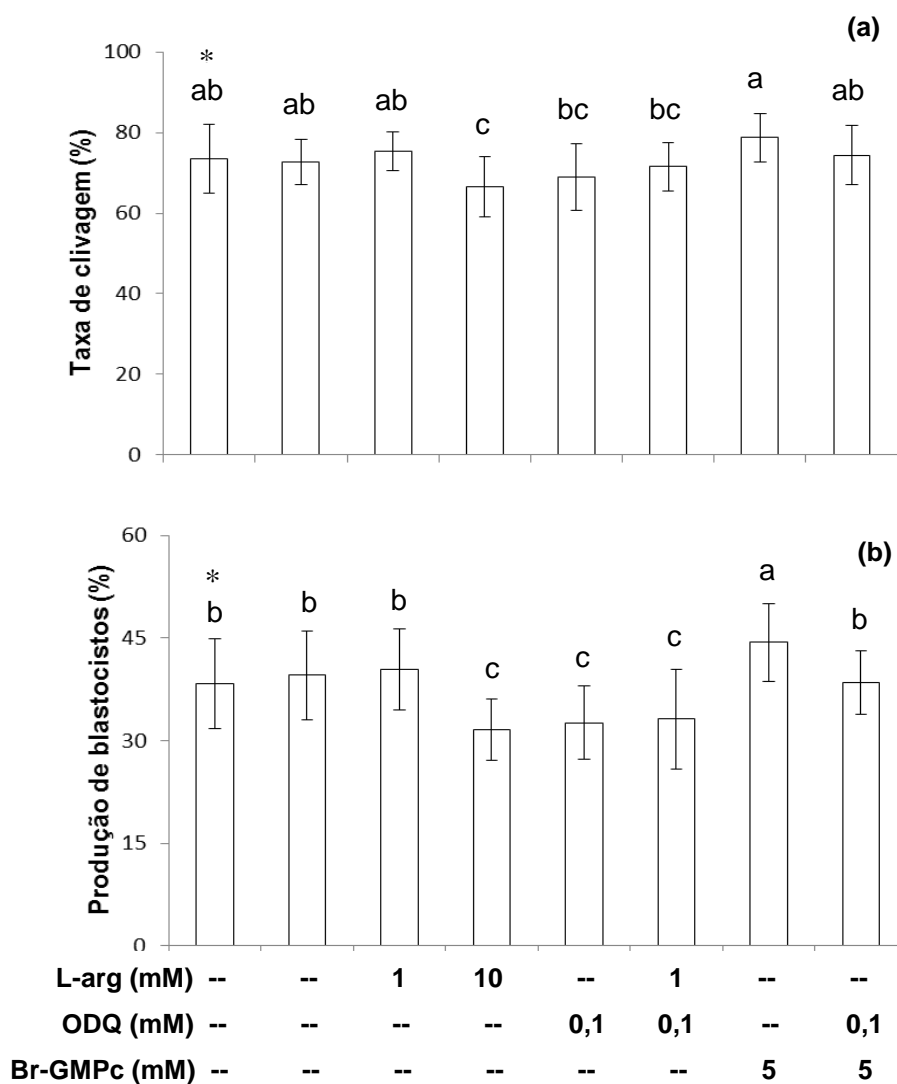


Figura 08- Papel do NO na capacitação espermática *in vitro* avaliada pela taxa de clivagem (a) e produção de blastocistos bovinos (b), $n=3$, após a adição de diferentes concentrações de L-arg, ODQ e Br-GMPc no meio de cultivo (30 min). (*) controle imediato, espermatozoides não capacitados. Diferentes letras sobre barras indicam diferenças ($P < 0,05$), $n=6$.

4- Discussão

A capacitação espermática, um processo que necessita do óxido nítrico (NO) para que ocorra (Zini *et al.* 1995, Sengoku *et al.* 1998, Miraglia *et al.* 2011) é essencial para a fertilização do oócito (Mendes *et al.* 2003). Embora o espermatozoide produza NO no processo de capacitação a partir da conversão da L-arginina em L-citrulina (Moncada & Higgs 1993), trabalhos recentes vem demonstrando que o aumento exógeno do NO, a partir da adição de L-arg no meio de capacitação, pode melhorar a qualidade espermática (Leal *et al.* 2009, Jagan Mohanarao & Atreja 2011) durante a capacitação, sugerindo que este aumento pode ter reflexo na produção *in vitro* de embriões. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do óxido nítrico (NO), a via L-arg/NO/GMPc e mecanismos de ação na capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos criopreservados, por meio da adição da L-arg, ODQ e Br-GMPc e seu reflexo na produção *in vitro* de blastocisto.

A melhora da motilidade após a adição de L-arg foi descrita em espermatozoides *in natura* de humanos (Keller & Polakoski 1975, Mendez & Hernandez 1993), bovinos (Leal *et al.* 2009) e bubalinos (Jagan Mohanarao & Atreja 2011), e tem sido utilizada em tratamentos de alguns problemas de fertilidade (Mendez & Hernandez 1993). Contudo, a concentração utilizada até o presente momento na literatura que melhorou a motilidade espermática foi 5 (Jagan Mohanarao & Atreja 2011) a 10 (Leal *et al.* 2009) vezes maior do que a utilizada neste trabalho, 1 mM de L-arg. Essa diferença pode ser explicada por termos utilizado espermatozoides criopreservados ao invés de sêmen *in natura*, sugerindo uma maior sensibilidade do espermatozoide após o descongelamento à concentração mais elevada de NO no meio capacitante. Essa hipótese também pode sustentar os resultados do presente trabalho de que após a adição de 5, 10 e 50 mM de L-arg ter ocorrido diminuição da motilidade (9,1; 37,5 e 53,2%, respectivamente).

O ODQ é um potente e seletivo inibidor da guanilato ciclase solúvel (GCs), pela oxidação do seu grupamento heme férrico (Schrammel *et al.* 1996). A GCs por sua vez, é responsável pela ativação do GMPc (Garthwaite *et al.* 1995), principal via utilizada pelo NO na capacitação espermática (Ignarro 2000). Após a adição de 0,1 mM de ODQ no meio de capacitação (4h) de espermatozoides bovinos criopreservados foi observado inibição da motilidade (59,2%), também demonstrada por Miraglia *et al.* (2011) ao adicionar 10 μ M de ODQ no meio de capacitação em

espermatozoides *in natura* de humanos. Essa diferença na concentração sugere que existem variações quanto a sensibilidade ao ODQ/GMPc/NO entre as diferentes espécies e o estado de conservação (*in natura*/criopreservado) do sêmen utilizado. Contudo, Miraglia *et al.* (2007) não observaram diferenças na motilidade ao utilizarem 50 μ M de ODQ, fato que pode ser explicado pelo pouco tempo de incubação do ODQ com os espermatozoides (20 min). Além disso, como a ação do ODQ é irreversível (Zhao *et al.* 2000), a adição da L-arg (1 mM) associado ao ODQ (0,1 mM) no meio de capacitação impediu o efeito inibitório do ODQ na motilidade demonstrando o envolvimento da via L-arg/NO/GMPc.

Receptores para GCs, enzima responsável pela ativação do GMPc, foram descritos na superfície de espermatozoides de camundongos recobrando o acrossoma e peça intermediária (Huang *et al.* 2006), espermátide de ratos (Muller *et al.* 2004), além do flagelo e cabeça de espermatozoides de ouriço do mar (Quill & Garbers 1998), sugerindo seu papel na fisiologia espermática em processos de motilidade, vigor, capacitação espermática e RA.

O aumento da síntese de GMPc estimula o metabolismo celular e aumenta a concentração de cálcio mitocondrial, resultando em aumento da concentração de ATP. Esses dois eventos resultam em um aumento da motilidade espermática (Zini *et al.* 1995, Sengoku *et al.* 1998). Lefievre *et al.* (2000) demonstraram um aumento dos parâmetros da motilidade após inibir a fosfodiesterase específica do GMPc (PD5), isoenzima responsável por sua hidrólise, pelo uso de 100 e 200 μ M de sildenafil no meio de cultivo (30, 90 e 180 min) de espermatozoides humanos. Essa inibição gera um aumento da concentração do GMPc (Glossman *et al.* 1999) e subsequentemente, ativação da via de sinalização de proteínas cinases dependente de GMPc envolvidas na motilidade (Miraglia *et al.* 2011), demonstrando que o aumento de GMPc no meio de capacitação está relacionado com o aumento da motilidade espermática.

Miraglia *et al.* (2011) demonstraram um aumento da motilidade após a adição de 0,5 mM de Br-GMPc no meio de cultivo de espermatozoides humano *in natura* por 30, 60 e 90 min. Esses resultados demonstram que em espermatozoides humanos *in natura* concentrações dez vezes menores de GMPc são capazes de induzir um aumento da motilidade comparado com espermatozoides de bovinos criopreservados, visto que neste trabalho a motilidade progressiva foi aumentada (13,9%) após a adição de 5 mM de Br-GMPc. Contudo, concentração mais elevada

de Br-GMPc (10 mM) não aumentou a motilidade, sugerindo que alta concentração de cálcio e ATP pode estar agindo em alguma outra via que impeça o aumento da motilidade espermática (Sengoku, 1998).

Não há nenhum trabalho na literatura relacionando o vigor espermático com Br-GMPc ou ODQ no meio de capacitação espermática. Neste trabalho, o vigor se comportou semelhante à motilidade após a adição dos diferentes tratamentos no meio de cultivo (4 h). O aumento do vigor após a adição de 1 mM de L-arg (15,4%) e 5 mM de Br-GMPc (19,2%) pode ser explicado pela maior disponibilidade de NO no meio de capacitação associado com o aumento da produção de energia resultante da melhora no potencial mitocondrial observado em ambos tratamentos. Estes resultados corroboram os achados de Leal *et al.* (2009) que demonstraram um aumento na produção de NO e na atividade mitocondrial após a adição de 10 mM de L-arg no meio de capacitação.

No presente estudo, observou-se aumento da integridade de membrana plasmática, acrossomal e do potencial mitocondrial após a adição de 1 mM de L-arg (43,4%) e 5 mM de Br-GMPc (49,2%) no meio de capacitação (4 h). Esse aumento da integridade de membranas e do potencial mitocondrial foi associado com uma diminuição da produção de hidróperóxido lipídico no espermatozoide (27,5% e 34,3; respectivamente) demonstrando que o aumento de NO (31,8 e 26,5%; respectivamente) teve efeito protetor contra lesões de membranas no espermatozoide ao longo da capacitação, sugerindo que o espermatozoide utiliza a L-arg exógena para produzir o NO ao invés de retirar da sua própria membrana, preservando assim a sua constituição. Além disso, o NO é limitador da peroxidação lipídica, agindo como uma espécie de terminação para a reação, alterando a reatividade de metais conhecidos para servir como catalisadores para sua geração (Rubbo *et al.* 1996). Ele ainda está envolvido na prevenção de alguns processos apoptóticos após a ativação da GCs (Estevez *et al.* 1998). Este efeito citoprotetor do NO também foi demonstrado por Ferreira-Berbari *et al.* (2010) em espermatozoides bovinos *in natura*.

Desde modo, a adição de 1 mM de L-arg e 5mM de GMPc no meio de cultivo tiveram o mesmo comportamento em todos os parâmetros avaliados, exceto na taxa de clivagem e produção *in vitro* de embriões. O aumento na taxa de clivagem (7,2%) e blastocistos (15,7%) demonstrada neste trabalho após a adição de 5 mM de Br-GMPc pode ser explicado pelo fato de que a adição do Br-GMPc age diretamente na via do NO, enquanto a adição da L-arg, aumenta a produção do NO e este por sua

vez, vai agir de duas formas: na via dependente de GMPc e na via independente do GMPc (Ignarro 2000).

Na via independente de GMPc, o NO está envolvido em reações com metais e radicais livres, agindo de forma fisiológica e patofisiológica (Ignarro 2000). A reação do NO com complexos de metal inclui a oxidação da hemoglobina com consumo de NO, redução de íons ferro, limitando a formação de radicais oxidantes e estresse oxidativo, formando radicais lipídicos envolvidos na peroxidação, inibindo a citocromo c oxidase, a catalase e citocromo P₄₅₀. Na reação com radicais, o NO age suprimindo a síntese de DNA pela inibição da nucleotídeo redutase (Kwon *et al.* 1991), reagindo com oxi-radicais formados durante a peroxidação lipídica (Rubbo *et al.* 1995).

A adição de concentrações mais elevadas de L-arg (10 e 50 mM) no meio capacitante diminuiu a integridade de membrana plasmática, acrossomal e o potencial mitocondrial (49,6 e 30,3%), fato que pode explicar a diminuição da motilidade (37,3 e 53,2%) e vigor (23 e 26,9%) espermático após a capacitação com estes tratamentos. A integridade de membrana está diretamente relacionada com a sobrevivência do espermatozoide e a atividade mitocondrial é essencial para produzir ATP, forma de energia utilizada nesse processo (Barbosa & Esper 1997). Esses resultados sugerem que pode estar ocorrendo uma retroalimentação negativa da atividade metabólica e produção de ATP pelo aumento excessivo da síntese de GMPc oriundo do aumento da concentração de NO após a capacitação com 10 e 50 mM de L-arg (188 e 250%, respectivamente).

Contudo, essa diminuição da integridade de membranas não foi acompanhada de um aumento da peroxidação lipídica, sugerindo que alta concentração de NO age desestabilizando as membranas por algum outro processo oxidante que não a peroxidação lipídica. Segundo Srivastava *et al.* (2006), a diminuição da peroxidação lipídica pela L-arg em espermatozoides *in natura* de caprinos obtido do epidídimo é dose dependente. Essa diferença pode ser explicada por termos trabalhado com a espécie bovina e ter sido utilizado sêmen criopreservado.

Além disso, apesar da adição de 10 mM de L-arg ter aumentado a capacitação (10,1%), houve uma diminuição da taxa de clivagem (9,4%) e produção de blastocistos (17,7%), possivelmente pelo aumento excessivo da produção de NO (220%) atuando como radical livre durante a capacitação *in vitro*. Essas alterações geram defeitos no genoma tais como fragmentação no DNA, podendo causar

anomalias no desenvolvimento embrionário normal a partir do embrião de 4 a 8 células, fase em que inicia a expressão dos genes paternos (Tesarik 2004, Tesarik 2005, Borini *et al.* 2006). Diferentemente, LEAL *et al.* (2009) observaram uma maior penetração em oócitos homólogos por espermatozoides bovinos *in natura* tratados com 10 mM de L-arg. Essa diferença pode ser explicada pela utilização de sêmen *in natura* ao invés de criopreservado, sugerindo uma maior sensibilidade do sêmen criopreservado. Além disso, Francavilla *et al.* (2000) também não observaram nenhuma alteração na penetração de oócitos homólogos após capacitação (5 h) de espermatozoides de humanos *in natura* com 6 mM de L-arg.

A adição de 10 mM de Br-GMPc, aumentou a produção de NO (255,2%), a integridade de membranas e o potencial mitocondrial (56,1%), e diferente da adição de 5 mM de GMPc, diminuiu a capacitação. Esse resultado pode ser explicado pelo aumento na porcentagem de espermatozoides que sofreram RA (60,2%) demonstrando que alta concentração de Br-GMPc (10 mM) induz à capacitação visto que apenas espermatozoides capacitados são hábeis em reagir o acrossoma (Lejeune & Delvaux 2010). No entanto, os espermatozoides sofreram estímulos além do necessário para permanecerem capacitadas e tão logo, reagiram o acrossoma, impedindo com isso, a fertilização. Esses achados estão de acordo com o descrito por estudos anteriores que demonstraram um efeito positivo na RA pelo aumento de NO no meio de capacitação após a adição de 10 mM de L-arg (O'Flaherty *et al.* 2004), 100 µM de SNP (doador de NO - Rodriguez *et al.* 2005) e pelo aumento do análogo do GMPc, 10 mM de Br-GMPc (Santos-Sacchi & Gordon 1980).

Os anions superóxidos gerados pelo espermatozoide em condições capacitantes e o peróxido de hidrogênio mantido durante a capacitação sugerem que as ROS são geradas pelo espermatozoide podendo ter efeitos benéficos quando em baixas concentrações (Aitken & Fisher 1994, Oehninger *et al.* 1995). A produção de hidroperóxidos lipídicos no espermatozoide bovino em todos os tratamentos utilizados neste estudo (L-arg, ODQ e Br-GMPc) foi quase 4 vezes maior do que a produção de peróxidos de hidrogênio no meio de capacitação (4 h). Além disso, a produção de peróxidos de hidrogênio foi semelhante após a adição de todos os tratamentos no meio de cultivo. No entanto, não podemos sugerir que o dano na membrana plasmática do espermatozoide sofrido pela peroxidação lipídica se deve em maior parte/ importância pelos hidroperóxidos lipídicos produzidos no espermatozoide pois o peróxido de hidrogênio pode ter reagido e lesado a

membrana antes mesmo de se difundir para o meio exterior visto que são moléculas altamente reativas (Armstrong *et al.* 1999, Bilodeau *et al.* 2001).

Vários estudos vêm relatando a importância do NO na qualidade espermática e seu impacto na produção *in vitro* de embriões (Leal *et al.* 2009, Ferreira-Berbari *et al.* 2010) e tem demonstrado que uma concentração ideal de NO é necessária durante a capacitação espermática para que este evento ocorra (Leal *et al.* 2009, Ferreira-Berbari *et al.* 2010). No entanto, o NO não é o fator determinante para a produção de embriões, existem outros fatores envolvidos na FIV, pois a quantidade de NO produzida com a adição de 1 mM de L-arg, 1 mM de L-arg + 0,1 mM de ODQ e 5 mM de GMPc foram as mesmas, porém, a produção de embriões foi diferente (40,3; 33,2 e 44,3% respectivamente), sugerindo que 1 mM de L-arg no meio capacitante, pode não ter estimulado a síntese da mesma quantidade de GMPc comparado com a adição de 5 mM de Br-GMPc, podendo ainda, a L-arg ter outras ações além da estimulação do NO na produção de GMPc, como estimulando outras substâncias que impeçam a produção *in vitro* de embrião. Além disso, o NO também tem efeitos independente do GMPc (Ignarro 2000) os quais podem estar de alguma maneira impedindo a obtenção da mesma taxa da produção *in vitro* de embriões bovinos.

A síntese de NO após 4 h de capacitação foi igual tanto após a adição de 50 mM de L-arg como com 10 mM de Br-GMPc. No entanto, a L-arg deve ativar/estimular alguma outra via, pois, nessa concentração ela causa efeitos deletérios na motilidade (53,2%) e no vigor (26,9%), com diminuição da integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial (69,7%). No entanto, apesar do Br-GMPc não alterar a motilidade e o vigor, foi observado um aumento da integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial (56,1%).

A adição de 5 mM de Br-GMPc aumentou (26,5%) a síntese de nitrato + nitrito comparado com o controle, sendo semelhante a produção de nitrato + nitrito quando adicionamos 1 mM de L-arg. No entanto, ao adicionarmos 10 mM de Br-GMPc a síntese de nitrato + nitrito aumentou em 188%, quase 11 vezes mais comparado com 5 mM de Br-GMPc, sugerindo um efeito de retro-alimentação positiva do GMPc na síntese de NO.

Não há na literatura nenhum registro que relacione a produção de nitrato e nitrito no meio de cultivo após a capacitação espermática, por isso, é de suma importância ressaltar nesse experimento que a produção de nitrato no meio de capacitação (4 h), após a adição de todos os tratamentos (L-arg, ODQ e Br-GMPc)

foi quase 3 vezes maior do que a produção de nitrito. No entanto, todos os tratamentos se comportaram de maneira semelhante na produção de nitrato e nitrito no meio capacitante, não nos permitindo afirmar que a concentração mais elevada de nitrato seja de alguma maneira mais importante para a capacitação espermática do que o nitrito.

A capacitação por sua vez, é um evento imprescindível para o sucesso da fertilização do ócito e depende do NO para que ocorra (Rodriguez *et al.* 2004, Leal *et al.* 2009, Jagan Mohanarao & Atreja 2011). A adição de 5 mM de Br-GMPc aumentou (26%) a capacitação comparado com o controle sendo semelhante ao observado com a adição de 1 mM de L-arg (39%). Esse aumento da capacitação se deve ao aumento da síntese de NO estimulada pelo Br-GMPc e pela L-arg, em relação ao controle.

A adição de 0,1 mM de ODQ aumentou (18,1%) a percentagem de espermatozoides não capacitados demonstrando que a inibição das guanilato ciclase solúveis (GCs) inibem a via do GMPc e como essa inibição é irreversível (Ignarro 2000), podemos afirmar que a adição de 1 mM de L-arg à 0,1 mM de ODQ, impediu o efeito inibitório do ODQ na capacitação ao invés de levar a uma reversão deste efeito. Contudo, a inibição da GCs pela ODQ (0,1 mM) também deve ativar/estimular alguma outra via que levou ao aumento (17,2%) da RA do espermatozoide.

A adição de 5 mM de Br-GMPc aumentou a capacitação (26%), confirmando que o NO age via GMPc. No entanto, ao adicionarmos 10 mM de Br-GMPc houve uma diminuição da capacitação (32%) e um aumento dos espermatozoides com RA (3%), sugerindo que estes espermatozoides foram estimulados a capacitar e em seguida, reagir o acrossoma (Lejeune & Delvaux 2010). Contudo, ao associarmos 10 mM de Br-GMPc à 0,1 mM de ODQ, ao invés de observarmos um impedimento do efeito inibitório do ODQ, este efeito inibitório foi potencializado pelo 10 mM de GMPc, sugerindo que a inibição das GCs pode ser potencializada por alta concentração de GMPc ou o GMPc estimula também outra via que aumenta a percentagem de espermatozoides não capacitados.

A concentração de GMPc no espermatozoide é baixa comparado com a de AMPc e permanece inalterada durante a capacitação (Stein & Fraser 1984). No entanto, o GMPc é a molécula responsável por aumentar a concentração de AMPc por meio da ativação de canais de potássio (K^+) no interior do espermatozoide (Cook & Babcock 1993). Esse aumento é responsável por ativar a cascata que leva a

fosforilação de proteínas (Tash 1989) em diferentes espécies de mamíferos (Leclerc *et al.* 1996, Nassar *et al.* 1999, Roy & Atreja 2008), pela ativação da tirosina cinase (Darszon *et al.* 2005) associada com o aumento da capacitação espermática (Lejeune & Delvaux 2010) em camundongos (Visconti *et al.* 1995), bovino (Galantino-Homer *et al.* 1997), equino (Pommer *et al.* 2003), bubalino (Jagan Mohanarao & Ateja 2011) e humanos (Leclerc *et al.* 1996) e da RA em bovino (Rodriguez *et al.* 2005) e humanos (Lefièvre *et al.* 2002).

Estudos sobre o papel do GMPc na capacitação espermática ainda são escassos. Experimentos prévios demonstraram que após a adição de 10 mM (38%) de Br-GMPc houve um aumento da percentagem de espermatozoides com aumento da integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial em relação a adição de 5 mM (36%) no meio de cultivo após 4 h (Leal *et al.* 2010). Apesar de ter dado diferença estatística, esta foi muito pequena para justificar o aumento da RA e diminuição da capacitação observada no tratamento com 10 mM em relação ao de 5 mM que apresentaram resultados inversos (Leal *et al.* 2011 - 4 h). Estes resultados devem estar ligado diretamente à vias de sinalização associado com o processo de capacitação espermática e RA propriamente dito.

Canais ligados a nucleotídeos cíclicos (GMPc) foram localizados ao longo da peça intermediária e peça principal de espermatozoides de bovinos (Wiesner *et al.* 1998) e estão associados na indução da capacitação em camundongos (Cisnero-Mejorado & Herrera 2012). A adição de 0,8 mM de Br-GMPc, tanto no meio capacitante como não capacitante, aumentou a percentagem de espermatozoides capacitados após 1 h de cultivo. Essas diferenças em relação ao presente experimento podem ser explicadas devido a maior sensibilidade dos camundongos ao GMPc comparado com bovinos. Santos-Sacchi & Gordon (1980) demonstraram que a adição de 10 mM de Br-GMPc no meio de capacitação por 1 h, aumentou a RA em cobaias, corroborando os achados deste trabalho. No entanto, em humanos esse aumento ocorreu após a adição de 1 mM de Br-GMPc no meio de cultivo por 4 h (Revelli *et al.* 2001). Essa diferença pode ser explicada ou porque em humanos a RA é induzida com uma menor concentração de GMPc ou porque o tempo de cultivo foi muito longo visto que nessa espécie, a capacitação ocorre ao redor de 1 h de incubação (Cohen-Dayag *et al.* 1995, Jaiswal *et al.* 1998). Apesar de não termos dosado o GMPc no meio de cultivo, a adição de 5 mM do Br-GMPc foi a

concentração ideal pois melhorou todos os parâmetros espermáticos avaliados neste trabalho resultando em um aumento na taxa de produção de blastocistos.

Esses resultados indicam que; 1) o NO está envolvido no controle da motilidade progressiva, vigor, integridade da membrana plasmática, acrossomal, potencial mitocondrial, peroxidação lipídica, capacitação induzida pela heparina via NOS/NO; 2) o NO está envolvido no controle da capacitação via GMPc; 3) uma concentração ideal de NO é necessária para a produção de embriões bovinos *in vitro* mas o NO não é o fator determinante e 4) a qualidade espermática sob a influência da via L-arg/NO/GMPc tem reflexo na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos técnicos do LRMGA (CCTA-UENF) Bruna Lomba Dias e Carla Paes de Carvalho pelo apoio durante o experimento, a Margot Alves Nunes Dode (Pesquisadora do CENARGEM/ EMBRAPA) pelo auxílio na execução da técnica de CTC no LRMGA-UENF. Esse trabalho teve apoio financeiro do CNPq (477072/2008-2009) e FAPERJ (E-26/111.604/2010). A.C.M.S, LEAL recebeu auxílio/bolsa CAPES.

Referências Bibliográficas

AITKEN RJ & FISHER H 1994 Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16 259-267.

AITKEN RJ, GORDON E HARKISS D, TWIGG J, MILNE P, JENNINGS Z & IRVINE DS 1998 Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59 1037-1046.

ARMSTRONG JS, RAJASEKARAM M, CHAMULITRAT W, GATTI P, HELLSTROM WJ & SIKKA SC 1999 Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Rad. Biol. Med.* 26 869-880.

BARBOSA RT & ESPER CR 1997 Avaliação e demonstração da atividade da citocromo c oxidase em espermatozoides bovinos. *Ars Vet. Jaboticabal* 13 218-223.

BILODEAU JF, BLANCHETTE S, GAGNON C & SIRARD MA 2001 Thiols prevent H₂O₂ – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56 275-288.

BORINI A, TAROZZI N, BIZZARO D, BONU MA, FAVA L & FLAMIGNI C 2006 Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum. Reprod.* 21 2876-2881.

CELEGHINI, E.C.C., DE ARRUDA, R.P., DE ANDRADE, A.F.C., NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C.F. (2007) Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. *Reprod. Dom. Anim.* 42: 479–488.

CHAMBERLAND A, FOURNIER V, TARDIF S, SIRARD MA, SULLRVAN R & BARLEY JL 2001 The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* 55 823-835.

CHENOWETH PJ 2011 Effects of the male on the embryo. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 35 154-159.

CISNERO-MEJORADO A & HERRERA DPS 2012 cGMP and cyclic nucleotide-gated channels participate in mouse sperm capacitation. *FEBS Letters* 586 149-153.

COHEN-DAIAG A, TUR-KASPA I, DOR J, MASHIACH S & EISENBACH M 1995 Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Porci. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 11039-11043.

COOK SP & BABCOCK DF 1993 Activation of Ca²⁺ permeability by c AMP is coordinated through the pH increase induced by speract. *J. Biol. Chem.* 268 22408-22413.

CORMIER N, SIRARD MA & BAILEY JL 1997 Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.* 18 461-468.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL 1998 Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2^a ed, Belo Horizonte, 49p.

de LOOS F, VAN VILET C, VAN MAURIK P & KRUIP TA 1989 Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res.* 24 197-204.

DARSZON A, NISHIGAKI T, WOOD C, TREVINO CL, FELIX R & BELTRÁN C 2005 Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *Int. Rev. Cytol.* 243 79-172.

DIXIT VD & PARVIZI N 2001 Nitric oxide and the control of reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 65 1-6.

ESTEVEZ AG, SPEAR N, THOMPSON JA, CORNWELL TL, RADI R, BARBEITO L & BECKMAN JS 1998 Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 18 3708-3714.

FERREIRA-BERBARI JBP, CALDAS-BUSSIÉRE MC, PAES DE CARVALHO CS & KNACKFUSS FB 2007 Efeito da adição de diferentes concentrações de ácido retinóico na motilidade e integridade de membrana de espermatozoides bovinos capacitados *in vitro*. *Acta Scie Vet* 35 (supl 03) p. 1091.

FERREIRA-BERBARI JBP, CALDAS-BUSSIÉRE MC, PAES DE CARVALHO CS, VIANA KS, LEAL ACMS & QUIRINO CR 2010 Efeito da inibição da óxido nítrico sintase induzível na capacitação de espermatozódes bovinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62 511-520.

FRASER LR 1995 Ionic control of sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7 905-925.

FUNAHASHI H 2002 Induction of capacitation and the acrosome reaction of boar spermatozoa by L-arginine and nitric oxide synthesis associated with the anion transport system. *Reproduction* 124 857-864.

FRANCAVILLA F, SANTUCCI R, MACEROLA B, RUVOLO G & ROMANO R 2000 Nitric Oxide synthase inhibition in human sperm affects sperm-oocyte fusion but not zona pellucida binding. *Biol. Reprod.* 63 425-429.

GALANTINO-HOMER HL, VISCINTI PE, KOPF GS 1997 Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* 56 707-719.

GARTHWAITE J, SOUTHAM E, BOULTON CL, NIELSEN E, SCHMIDT K & MAYER B 1995 Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1-H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharm.* 48 184-188.

GATH I, CLOSS EI, GODTEL-ARMBRUST U, SCHMITT S, NAKANE M, WESSLER I & FORSTERMANN U 1996 Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: implications for contractile function. *FASEB J.* 10 1614-1620.

GUZMAN-GRENFELL AM 1999 Effect of nitric oxide releasers on some metabolic processes of rabbit spermatozoa. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 42 19-123.

HERRERO MB, CHATTERJEE S, LEFRIEVE L, de LAMIRANDE E & GAGNON C 2000 Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Rad. Biol. Med.* 29 522-536.

HUANG YH, WEI CC, SU YH, WO BT, CIOU YY, TU CF, COOPER TG, YEUNG CH, CHU ST, TSAI MT & YANG RB 2006 Localization and characterization of an orphan receptor, guanylyl cyclase-G, in mouse testis and sperm. *Endocrinology* 147 4792-4800.

IGNARRO LJ 2000 Introduction and Overview. In: Ignarro, L.J. (ed.) *Nitric oxide. Biol. Pathobiol.* San Diego: Academic Press, p. 12-17.

JAGAN MOHANARAO G & ATREJA SK 2011 Identification of NO induced and capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Res. Vet. Sci.*, doi:10.1016/j.rvsc.2011.09.017.

JAISWAL BS, COHEN-DAYAG A, TUR-KASPA I & EISENBACH, M 1998 Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS Letters* 427 309-313.

KLLER DW & POLAKOSKI FL 1975 L-arginina stimulation of sperm motility in vitro. *Soc. St. Reprod.* 13 154-157.

KWON NS, STUEHR DJ & NATHAN CE 1991 Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J. Exp. Med.* 174 761-767.

LEAL ACMS, CALDAS-BUSSIÈRE MC, PAES DE CARVALHO CS, VIANA KS & QUIRINO CR 2009 Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced *in vitro* capacitation. *Anim. Reprod. Sci.* 116 38-49.

LEAL ACMS, CALDAS-BUSSIÈRE MC, QUIRINO CR & SILVA PAMP 2010 Vias e mecanismos de ação do óxido nítrico na integridade de membranas de espermatozoides de bovinos criopreservados após a capacitação *Acta Sci. Vet.*, v.38, p.685.

LEAL ACMS, CALDAS-BUSSIÈRE MC, QUIRINO CR & PAES DE CARVALHO 2011 Ação do óxido nítrico via GMPc na capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos criopreservados. *Acta Sci. Vet.*, v.39, p.339.

LECLERC P, de LAMIRANDE E & GAGNON C 1996 Cyclic adenosine 3',5' monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol. Reprod.* 55 684-695.

LEFIEVRE L, de LAMIRANDE E & GAGNON C 2000 The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J. Androl.* 21 929-937.

LEJEUNE T & DELVAUX P 2010 Sperm Capacitation: Physiology, molecular mechanisms and relevance for fertilization. *In: Lejeune, T., Delvalux, P. (ed.) Humam Spermatozoa* New York: Nova Biomedical, p. 96-99.

LEWIS SEM & AITKEN RJ 2005 DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell. Tiss. Res.* 322 33-41.

LOWENSTEIN CJ, DINERMAN J & SNYDER SH 1994 Nitric oxide a physiologic messenger. *Ann. Int. Med.* 120 227-237.

MANUAL para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 1988. 49p.

MENDES Jr J, BURNS P, SANCHES JD & SEIDEL Jr G 2003 Effects of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology* 60 331-340.

MIRAGLIA E, RULLO ML, BOSIA A, MASSOBRIO M, REVELLI A & GHIGO D 2007 Stimulation of the nitric oxide/ cyclic guanosine monophosphate signaling pathway elicits human sperm chemotaxis *in vitro*. *Fertil. Steril.* 87 1059-1063.

MIRAGLIA E, de ANGELIS F, GAZZANO E, HASSANPOUR H, BERTAGNA A, ALDIERI E, REVELLI A & GHIGO D 2011 Nitric oxide stimulates human sperm motility via activation of the cyclic GMP/protein kinase G signaling pathway. *Reproduction* 141 47-54.

MULLER D, MUKHOPADHYAY AK, SPETH RC, GUIDONE G, POTTHAST R, POTTER LR & MIDDENDORFF R 2004 Spatiotemporal regulation of two atrial natriuretic peptide receptors in testis. *Endocrinology* 145 1392-1401.

MEISER H & SCHULZ R 2003 Detection and localization of two constitutive NOS isoforms in bull spermatozoa. *Anat. Histol. Embriol.* 32 321-325.

MENDEZ JD & HERNANDEZ MP 1993 Efecto de L-arginina y poliaminas sobre la movilidad espermática. *Ginecol. Obstet. Mex.* 61 229-234.

MONCADA S, PALMER RMJ & HIGGS EA 1992 Nitric Oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43 109-142.

MONCADA S & HIGGS EA 1993 The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl. J. Med.* 329 2002-2012.

NASSAR A, MAHONY M, MORSHEDI M, LIN MH, SRISOMBUT C & OEHNINGER S 1999 Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil. Steril.* 71 919-923.

OEHNINGER S, BLACKMORE P, MAHONY M & HODGEN G 1995 Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.* 12 41-47.

O'FLAHERTY C, RODRIGUEZ P & SRIVASTAVA S 2004 L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Bioch. Bioph. Acta* 1674 215-221.

PAES de CARVALHO C, CALDAS-BUSSIÈRE MC, CARVALHO FP, UENO VG & QUIRINO CR 2003 Efeito do óxido nítrico na capacitação *in vitro* induzida ou não pela heparina em espermatozoide bovino. *Acta. Scie. Vet.* (supl 01) p. 516.

PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH JL, WINER MA & FIRST NL 1988 Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38 1171-1180.

PARRISH JJ & EID L 1994 Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol. Reprod.* 51 1232-1237.

POMMER AC, RUTTLANT J & MEYERS SA 2003 Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol. Reprod.* 68 1208-1214.

QUILL TA & GARBERS DE 1998 Fertilization common molecular signaling pathways across the species. In O'Malley BW, ed. *Hormones and signaling*. San Diego. Academic Press. 167-207.

REVELLI A, COSTAMAGNA C, MOFFA F, ALDIERI E, OCHETTI S, BOSIA A, MASSOBRIO M, LINDBLOM B & GHIGO D 2001 Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 64 1708-1712.

RICART-JANÉ D, LOBERA M & LOPEZ-TEJERO MD 2002 Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the griess method. *Nitric Oxide* 6 178-185.

RODRIGUEZ PC, O'FLAHERTY CM, BECONI MT & BEORLEGUI NB 2004 Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. *Anim. Reprod. Sci.* 85 231- 242.

RODRIGUEZ PC, O'FLAHERTY CM, BECONI MT & BEORLEGUI NB 2005 Nitric oxide induces acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia* 37 166-172.

RODRIGUEZ PC, VALDEZ LB, ZAORBONYJ T, BOVERIS A & BECONI MT 2011 Nitric oxide and superoxide anion production during heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 46 74-81.

ROY SC & ATREJA SK 2008 Tyrosine phosphorylation of a 38-kDa capacitation-associated buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm protein is induced by L-arginine and regulated through a cAMP/PKA-independent pathway. *Intern. J. Androl.* 31 12-24.

RUBBO H, PARTHASARATHY S, BARNES S, KIRK M, KALYANARAMAN B & FREEMAN BA 1995 A nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen containing oxidized lipid derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* 324, 15-25.

RUBBO H, DARLEY-USMAR V & FREEMAN BA 1996 Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem. Res. Toxicol.* 9 809-820.

SANTOS-SACCHI J & GORDON M 1980 Induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa by cGMP analogues. *J. Cell Biol.* 85 798-803.

SCHRAMMEL A, BEHREND S, SCHMIDT K, KOESLING D & MAYER B 1996 Characterization of 1-H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3,a]quinoxalin-1-one as a Heme-Site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol. Pharm.* 5 1-5.

SENGOKU K, TAMATE K, YOSHIDA T, TAKAODA Y, MIYAMOTO T & ISHIKAWA M. 1998 Effects of low concentration of nitric on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 69 522-527.

SRIVASTAVA S, DESAI P & GOVIL G 2006 Mechanism of action of L-arginine on the vitality of spermatozoa is primarily through increased biosynthesis of nitric oxide. *Biol. Reprod.* 74 954-958.

STEIN DM & FRASER LR 1984 Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation *in vitro*. *Gamete Res.* 10 283-299.

STRINGFELLOW DA & SEIDEL SM 1999 Um guia de procedimento e informação geral para o uso da tecnologia da transferência de embriões, enfatizando precauções sanitárias. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*, 3 edição.

TASH JS 1989 Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil. Cytoskeleton* 14 332-339.

TESARIK J, GRECO E & MENDOZA C 2004 Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum. Reprod.* 19 611-615.

TESARIK J 2005 Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod. BioMed Online* 10 370-375.

VISCONTI PE, MOORE GD, BAILEY JL, LECLERC P, CONNORS S, PAN D, OLDS-CLARKE P & KOPF GS 1995 Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121 1139-1150.

WIESNER B, WEINER J, MIDDENDORFF R, HAGEN V, KAUPP UB & WEYAND I 1998 Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{2+} entry into sperm. *J. Cell Biol.* 142 473-484.

ZINI A, de LAMIRANDE E & GAGNON C 1995 Low levels of nitric oxide promote sperm capacitation *in vitro*. *J. Androl.* 16 424-431.

APÊNDICE

I) MEIO DE CAPACITAÇÃO

1) TALP-SP Estoque

H ₂ O		(Concentração mM)	50 mL
NaCl	Gibco	100	0,292 g
NaH ₂ PO ₄	Sigma/S-0751	0,29	0,00175 g
KCl	Sigma/P-5405	3,1	0,0115 g
Ac. Lático siruposo 98%	Sigma/L-4263	0,112	95 µL
Hepes	Gibco	10	0,119 g
NaHCO ₃	Sigma/S-6297	25	0,105 g
Phenol Red	Sigma/P-5530	0,028	0,0005 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma/C-3881	2,1	0,0155 g
MgCl ₂ +6H ₂ O	Sigma/M-0250	0,4	0,004 g
P/S	Estoque	100µg/mL	50 µL
pH: ±7,3. Filtrar e estocar na geladeira por duas semanas. mOsm. ±285			

2) TALP-SP Uso

Talp-sp estoque			10 mL
BSA (livre de ác. graxo)			0,06 g
Piruvato	Sigma/P-4562		30 µL
Heparina	Estoque		100 µL
Para uso diário.			

3) Heparina (Estoque)

NaCl 0,9%		5,0 mL	10 mL
Heparina	Sigma/H-1304	0,005g	0,010 g
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)			

4) Penicilamina/estreptomicina (P/S Estoque)			
			Volume
H ₂ O		100 mL	20,0 mL
Penicilina (100UI/mL)	Sigma/P-7794	6,1 g	1,22 g
Estreptomicina (100µg/mL)	Sigma/S-9137	5,0 g	1,0 g
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)			

5) Ácido pirúvico			
TCM 199			1 mL
Piruvato	Sigma/P-5280		0,010 g
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)			

6) Preparação do Percoll 90%			
Percoll comercial	Nutricell		1,350 mL
Talp SP 10x			150 µL

7) Preparação do Percoll 45%			
Percoll 90%	Nutricell		500 µL
Talp SP			500 µL
Colocar o percoll 90% em um tubo e, em seguida adicionar o 45% lentamente – Estabilizar por uma hora			

8) Preparação do sêmen para capacitação

- Descongelar a palheta de sêmen à 37°C por 30 segundos;
- Adicionar lentamente o sêmen na parte superior do gradiente percoll
- Centrifugar a 700 x g/10 minutos
- Retirar o sobrenadante com cuidado e adicionar 5 mL de TALP sobre o pellet;
- Centrifugar novamente a 200 x g/2 minutos
- Retirar o sobrenadante, ajustar a concentração para 50 x 10⁶ espermatozoide/ mL e capacitar por 4h, nos diferentes tratamentos.

II) TRATAMENTOS

1) L-Arginina (Solução Mãe)

		Concentração	Volume 1 mL
L-arginina	Sigma/A3784	0,06 M	0,00435 g
Talp-sp Uso			1mL
Para uso diário			

2) L-Arginina Uso

Concentração	Talp-sp Uso	L-arginina (Sol. Mãe)
1 mM	192 µL	8 µL
2,5 mM	180 µL	20 µL
5 mM	160 µL	40 µL
10 mM	120 µL	80 µL
50 mM	20 µL	180 µL
Para uso diário		

3) ODQ (Estoque)

		Concentração	ODQ
ODQ	Sigma/O3636	0,01 M	5 mg
Talp-sp Uso			2670 µL
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)			

4) ODQ Uso

Concentração	Talp-sp Uso	ODQ (Estoque)
0,1 mM	198 µL	2 µL
Para uso diário		

5) Br-GMPc (Estoque)

		Concentração	GMPc
ODQ	Sigma/B1381	1 M	10 mg
Talp-sp Uso			224 µL
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)			

6) Br-GMPc Uso		
Concentração	Talp-sp Uso	Br-GMPc (Estoque)
5 mM	199 µL	1 µL
10 mM	198 µL	2 µL
Para uso diário		

III) MEIOS ESTOQUES PARA MIV, FIV e CIV

1) Gentamicina sulfato		
		Volume
NaCl 0,9%		10,0 mL
Gentamicina (50 mg/mL)	Sigma/G-1272	0,5 g
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)		

2) FSH		
Diluição em TCM-199	Folltropin-v	0,5 µg/mL
Filtrar e estocar no freezer (validade seis meses)		

3) Solução Salina			
H ₂ O		10 mL	100 mL
NaCl (0,9%)	Gibco	0,09 g	0,9 g
Filtrar e estocar na geladeira por duas semanas			

4) Epinefrina		
H ₂ O		50 mL
Ácido láctico		165mg=130µL
Metabissulfito (Na ₂ S ₂ O ₅)	Sigma/S-9000	50 mg
Retirar 40 mL e acrescentar a epinefrina		
Epinefrina	Sigma/E-4250	1,83 mg
Filtrar e estocar no freezer (proteger da luz)		

5) Hipotaurina			
NaCl 0,9%		5,0 mL	10,0 mL
Hipotaurina	Sigma/ H-1384	0,545 mg	1,09 mg
Filtrar, fazer alíquotas e estocar no freezer (validade seis meses)			

6) Penicilamina			
NaCl 0,9%		5,0 mL	10,0 mL
Penicilamina	Sigma/P-5280	15 mg	0,003 mg
Filtrar e fazer alíquotas			

7) PHE (Proteger da luz)			
NaCl (0,9%)			40 µL
Penicilamina	2 mM		25 µL
Hipotaurina	1 mM		25 µL
Epinefrina	250 mM		10 µL

8) TALP-FEC Estoque			
H ₂ O		(Concentração mM)	50 mL
NaCl	Gibco	114	0,333 g
NaH ₂ PO ₄	Sigma/S-0751	0,4	0,002 g
NaHCO ₃	Sigma/S-6297	2,4	0,105 g
KCl	Sigma/P-5405	3,1	0,012 g
MgCl ₂ +6H ₂ O	Sigma/M-0250	0,5	0,005 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma/C-3881	2,0	0,015 g
Ac. Lático siruposo 98%	Sigma/L-4263		72 µL
Phenol Red	Sigma/P-5530		0,001 g
Piruvato	Sigma/P-4562	0,01	0,0011 g
P/S	Estoque		50 µL
Retirar 3 mL e adicionar BSA (livre de ácido graxo)			
pH: ±7,8. Filtrar e estocar na geladeira por duas semanas. mOsm. ± 285			

IV) MEIOS DE ROTINA (MIV, FIV e CIV)

1) Meio de lavagem e manipulação de oócitos

	Volume
TCM-199/Hepes	8,8 mL
Soro (10% SFB)	1 µL
Piruvato	20 µL
Gentamicina	50 µL
Para uso diário	

2) MIV

	Volume
TCM-199	4,4 mL
FSH (0,5µg/mL)	50 µL
Gentamicina	25 µL
Soro (10% SFB)	0,5 mL
Piruvato	10 µL
Para uso diário. Fazer gotas em placa 35 X 100 mm de 100 µL e cobrir com óleo mineral.	

3) FIV

	Volume
Talp-Fec estoque	5 mL
BSA livre de ácido graxo	0,03 g
Piruvato	10 µL
Gentamicina	25 µL
Heparina	35 µL
PHE	220 µL
Para uso diário. Proteger da luz. Fazer gotas em placa 35 X 100 mm de 80 µL e cobrir com óleo mineral.	

4) SOF Semanal

Volume 13 mL	
H ₂ O	10 mL
Myo-inositol	0,0063 g
Tricitrato de sódio	0,0013g
SOF Estoque A	1,25 mL
SOF Estoque B	1,25 mL
BME (50X)	375 µL
MEM (100X)	125 µL
L-Glutamina	12,5 µL
Piruvato	0,0010 g
Glicose	0,0023 g
Glicina	0,0047 g
Taurine	0,0075 g
Para uso semanal	

5) CIV

Volume 6,5 mL	
SOF semanal	6,5 mL
Gentamicina	36 µL
Soro (10% SFB)	0,72 µL
BSA	0,0433 g
Para uso diário	

6) Preparação do sêmen para FIV

- Descongelar a palheta de sêmen e passar no percoll de acordo com o item I – 8
- Retirar o sobrenadante, realizar a capacitação prévia por 30' e ajustar a concentração da dose inseminante fixada em $1,6 \times 10^6$ espermatozóides/mL.

V) MEIOS PARA COLORAÇÃO

1) Iodeto de Propídio, Hoescht, PSA, JC1 (Estoque)

	Volume
Iodeto de propídio	25 mg
DMSO	1 mL
Hoescht	100 mg
DMSO	4 mL
FITC-PSA	2 mg
PBS	20 L
Solução azida de sódio	1%
JC1	5 mg
DMSO	1 mL
Pode ser estocado à -20 °C (validade - 3 meses)	

2) Iodeto de Propídio (Uso)

	Volume
Iodeto de propídio (Estoque)	20 µL
PBS	980 µL
Adicionar 1 µL da solução uso para 50 µL de sêmen	

3) Hoescht (Uso)

	Volume
Hoescht (Estoque)	4 µL
PBS	996 µL
Adicionar 0,7 µL da solução uso para 50 µL de sêmen	

4) JC1 (Uso)

	Volume
JC1 (Estoque)	10 µL
PBS	490 µL
Adicionar 2 µL da solução uso para 50 µL de sêmen	

5) FITC-PSA (Uso)

Adicionar 17 µL da solução estoque para 50 µL de sêmen	
--	--

VI) MEIOS PARA DOSAR NITRATO E NITRITO

1) Solução de PBS

pH – 7,4 filtrar e estocar na geladeira (validade dois meses)		Volume
NaCl	8 g	0,8 g
KCl	0,2 g	0,02 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g	0,115 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g	0,02 g
H ₂ O		1000 mL

2) Solução estoque de nitrito de sódio

	Volume
NaNO ₂ (S-3421)	0,0345 g
H ₂ O deionizada	5 mL

3) Solução nitrito de sódio 100 mM

	Volume
NaNO ₂ (estoque)	10 µL
TCM-199	990 µL

4) Solução nitrito de sódio 10 mM

	Volume
NaNO ₂ (100 mM)	10 µL
TCM-199	90 µL

5) Solução nitrito de sódio 1 mM

	Volume
NaNO ₂ (10 mM)	10 µL
TCM-199	90 µL

6) Curva padrão (nitrito/nitrato)		
Concentração (μM)	1 mM de nitrito (μL)	Meio Talp-sp (μL)
0	0	1000
1	1	999
5	5	995
10	10	990
25	25	975
50	50	950
75	75	925
100	100	900
150	150	850
200	200	800
250	250	750
300	300	700
350	350	650
400	400	600

Fazer alíquotas de 1 mL, congelar e armazenar.
Utilizar meio Talp-sp sem soro fetal

7) Soluções (nitrito/nitrato)		
		Volume
1)	NADPH (N-1630)	25 mg
	H ₂ O deionizada	5 mL
2)	Nitrato Redutase (N-7265)	10 UI
	H ₂ O deionizada	500 μL
3)	KH ₂ PO ₄	6,805 g
	H ₂ O deionizada	100 mL
Preparo do coquetel		
	NADPH	1000 μL
	KH ₂ PO ₄	1000 μL
	Nitrato Redutase diluída (100 μL em 900 μL de H ₂ O)	1000 μL
	H ₂ O deionizada	1000 μL

8) Corante de Griess

		Volume
H ₃ PO ₄ (5%)		
	H ₃ PO ₄	2,5 mL
	H ₂ O deionizada	50 mL
Solução A		
	Sulfalamida	0,5 mg
	H ₃ PO ₄ (5%)	25 µL
Solução B		
	NEED 1%	0,05 g
	H ₂ O deionizada	25 mL
2 mL da solução A + 2 mL da solução B + 2 mL de H ₃ PO ₄ (5%) + 2 mL de H ₂ O deionizada		
Utilizar 50 µL de sêmen capacitado + 50 µL de reagente de griess		

9) Mensuração do nitrito/nitrato

- 1- Pipetar 160 µL de branco (somente meio de maturação);
- 2- Pipetar 40 µL da curva e das amostras na placa de 96 poços;
- 3- Pipetar 40 µL do coquetel nos poços, menos no branco;
- 4- Deixar a placa a 37 °C overnight para que ocorra a reação (NO₃→NO₂);
- 5- NO dia seguinte, colocar 80 µL do corante Griess;
- 6- Fazer análise em leitor ELISA em 540 nM.

VII) MEIOS PARA AVALIAR A CAPACITAÇÃO PELO TESTE DE CLORTETRACICLINA

1) Tris-base (20 mM)

		Volume
Tris-base		0,242g
H ₂ O destilada		100 mL

2) NaCl (130 mM)	
	Volume
CTC	0,759 mg
H ₂ O destilada	100 mL
Associar a solução Tris-base com HCl. Fazer alicotas de 10 mL e estocar a -20°C (validade - 3 meses)	

3) Cysteina-HCl (5 mM)	
	Volume
Cysteina	7,88 mg
Tris base + NaCl	10 mL
Para uso diário	

4) CTC (750 µM)	
	Volume
CTC	0,386 mg
Cysteina-HCl (5mM)	1 mL
Diluir no vórtex. Para uso diário	

5) Preparo da Lâmina	
	Volume
Solução final de CTC	15 µL
Espermatozoides (25x10 ⁶)	15 µL
Paraformaldeído (4%)	10 µL
DABCO (0,22 M)	6 µL