



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE
ESPERMATOZOIDES CAPRINOS E OVINOS SUBMETIDOS À
CRIOPRESERVAÇÃO COM TROLOX**

LÚCIA CRISTINA PEREIRA ARRUDA

RECIFE – PE

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE
ESPERMATOZOIDES CAPRINOS E OVINOS SUBMETIDOS À
CRIOPRESERVAÇÃO COM TROLOX**

LÚCIA CRISTINA PEREIRA ARRUDA

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

RECIFE – PE

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

A778p Arruda, Lúcia Cristina Pereira
Peroxidação lipídica da membrana plasmática de espermatozoides caprinos e ovinos submetidos à criopreservação com Trolox / Lúcia Cristina Pereira Arruda. -- Recife, 2014.
66 f.: il.

Orientador (a): Maria Madalena Pessoa Guerra.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.
Referências.

1. Lipoperoxidação 2. Antioxidantes 3. Sêmen 4. Trolox 5. Caprinos 6. Ovinos I. Guerra, Maria Madalena Pessoa, orientadora II. Título

CDD 591.4

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação às pessoas que sempre estiveram ao meu lado pelos caminhos da vida, me acompanhando, apoiando e, principalmente, acreditando em mim: meus pais.

Dedico também a minha filha, a quem peço desculpas por todos os momentos que estive ausente durante essa jornada e para Nenem (nossa babá), pois sem a força, compreensão e ajuda a realização desse trabalho não seria possível.

“O êxito não é resultado do acaso, mas da insistência em seus objetivos”

(Autor Desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que fazem parte do ANDROLAB, pois todos de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada, Ellen, Helder, Adalberto, Joane, Thalles, Juliana, Pierre, Igor e Chirlane;

Agradeço especialmente ao Dr. André Mariano Batista, que dedicou muito do seu tempo me orientando, embora tivesse milhares de outros afazeres. Obrigada pelos ensinamentos, atenção, amizade e dedicação ao longo deste período;

Agradeço à Dr^a. Sildivane Valcácia Silva, que muito me ajudou na elaboração inicial deste projeto;

Agradeço imensamente a Girliane Regina, que me acompanhou nas análises e muito contribuiu, tornando possível a realização do trabalho;

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Tania Sarmento, por ter disponibilizado seu laboratório, material e tempo para orientação e direcionamento das análises por HPLC;

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Madalena Guerra, pela oportunidade de ser sua orientada e por todo conhecimento que tem nos transmitido ao longo desses anos, além da confiança, força e incentivo para buscarmos novas informações a cada dia;

Agradeço também à FACEPE, pela disponibilização da bolsa de estudos e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

E, por fim, agradeço aos animais, pois sem eles não existiria experimento.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

SUMÁRIO

Página

	DEDICATÓRIA	
	AGRADECIMENTOS	
	LISTA DE FIGURAS	
	LISTA DE TABELAS	
	ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	
	RESUMO	
	ABSTRACT	
1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
	2.1 Membrana plasmática.....	19
	2.2 Espécies reativas ao oxigênio (ROS).....	21
	2.3 Peroxidação lipídica (LPO).....	22
	2.4 Antioxidantes.....	23
	2.4.1 Vitamina “E” e Trolox.....	24
	2.5 Métodos para avaliação da peroxidação lipídica.....	25
	2.5.1 Espectrofotometria e cromatografia líquida de alta performance.....	25
	2.5.2 C ₁₁ -BODIPY ^{581/591}	26
3	OBJETIVOS.....	27
	3.1 Objetivo Geral.....	27
	3.2 Objetivos específicos.....	27
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

5	ARTIGOS.....	35
	5.1 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE CAPRINOS E OVINOS.....	35
	5.2 ESTUDO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE CAPRINOS E OVINOS COM TROLOX.....	50
6	CONCLUSÕES.....	66

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	
Curva padrão gerada pelos padrões de TEP, mostrando a correlação entre a área de pico e as concentrações de MDA (HPLC-DAD). Coeficiente de correlação para a linha de regressão foi $r=0.9998688$ para as concentrações entre 0,625 e 10nmol/mL.....	41
Figura 2	
Curva padrão gerada pelos padrões de TEP, mostrando a correlação entre a absorbância e as concentrações de MDA (Espectrofotômetro-UV-Visível). Coeficiente de correlação para a linha de regressão foi $r=0.9972$ para as concentrações entre 0,625 e 10nmol/mL.....	41

LISTA DE TABELAS

Artigo-1		Página
Tabela 1	Valores médios da concentração de malonaldeído (nmol/mL) e porcentual de espermatozoides portadores de peroxidação lipídica, obtidos pelo uso do C ₁₁ -BODIPY ^{581/591} em amostras criopreservadas de sêmen de caprinos e ovinos.....	49
Artigo-2		
Tabela 1	Valores médios dos parâmetros cinéticos e percentuais de espermatozoides caprinos após criopreservação em leite desnatado, adicionado ou não de Trolox com membrana plasmática e acrossoma intactos.....	63
Tabela 2	Valores médios dos parâmetros cinéticos e percentuais de espermatozoides ovinos após criopreservação em tris-gema de ovo, adicionado ou não de Trolox com membrana plasmática e acrossoma intactos.....	64
Tabela 3	Valores médios da concentração de malonaldeído (nmol/mL) em amostras de diluidor, de sêmen fresco e criopreservado e do porcentual de células espermáticas marcadas com peroxidação pela sonda fluorescente C ₁₁ -BODIPY ^{581/591} , obtidos de reprodutores caprinos adicionadas ou não de Trolox.....	65
Tabela 4	Valores médios da concentração de malonaldeído (nmol/mL) em amostras de diluidor, de sêmen fresco e criopreservado e do porcentual de células espermáticas marcadas com peroxidação pela sonda fluorescente C ₁₁ -BODIPY ^{581/591} , obtidos de reprodutores ovinos adicionadas ou não de Trolox.....	65

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

AGPI - ácidos graxos poliinsaturados

C₁₁-BODIPY^{581/591} - 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a-ácido4a-diaza-s-indaceno-3-undecanóico.

HPLC – cromatografia líquida de alta performance

iAc – integridade de acrossoma

LIN - linearidade

LPO - lipoperoxidação ou peroxidação lipídica

LOOH - hidroperóxidos lipídicos

MDA - malonaldeído

Mp - motilidade progressiva

MP – membrana plasmática

iMP- integridade de membrana plasmática

Mt – motilidade total

RL – radical livre

ROS – espécies reativas ao oxigênio

STR - retilinearidade

TBA – ácido 2-tiobarbitúrico

TBARs – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

VAP – velocidade média da trajetória

VCL - velocidade curvilínea

VSL – velocidade em linha reta

WOB – índice de oscilação

O₂⁻ - ânion superóxido

OH⁻ - radical hidroxila

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

NO₂ - óxido nítrico

ATP - adenosina trifosfato

TROLOX – 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico, posteriormente denominado de Trolox[®] C

DNA – ácido desoxirribonucleico

SOD – superóxido dismutase

CAT – catalase

GPx – glutathione peroxidase

pH – potencial hidrogeniônico

UV – ultravioleta

TEP - tetrametoxipropano

RESUMO

Objetivando identificar o melhor método para avaliar a peroxidação lipídica em espermatozoides de caprinos e ovinos, amostras de sêmen foram diluídas em leite desnatado (Glicerol 7%) e Tris-gema de ovo (Glicerol 5%), respectivamente, e congeladas (-196 °C). Após descongelação (37 °C/30s), as amostras foram submetidas à avaliação da peroxidação lipídica por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta performance - DAD (método de TBARS) e citometria de fluxo (C₁₁-BODIPY^{581/591}). Observou-se que as concentrações de malonaldeído obtidas por espectrofotometria foram significativamente maiores que as encontradas pelo método de HPLC. O C₁₁-BODIPY^{581/591} complementou os dados obtidos pelo método do TBARS (HPLC), auxiliando na melhor compreensão dos resultados, evidenciando danos ocorridos às células. Concluindo-se que o método de dosagem de TBARS pelo HPLC e C₁₁-BODIPY^{581/591} são os mais indicados para avaliação da peroxidação lipídica em espermatozoides de caprinos e ovinos podendo ser utilizados com sucesso juntas ou isoladamente. Determinados os melhores métodos, avaliou-se a ocorrência de peroxidação lipídica da membrana plasmática de espermatozoides caprinos e ovinos criopreservados com diluidor suplementado com Trolox, onde amostras de sêmen foram diluídas em leite desnatado (caprino) ou tris-gema de ovo (ovinos), sem antioxidante (grupo controle) ou adicionadas de Trolox nas concentrações de 20µM ou 40 µM /mL (tratamentos). Após descongelação a 37 °C/30s, as amostras foram submetidas à avaliação da peroxidação lipídica por cromatografia líquida de alta performance (HPLC-DAD) e citometria de fluxo (C₁₁-BODIPY^{581/591}). Analisou-se ainda a integridade de membrana plasmática, acrossomal e cinética espermática. Amostras dos diluidores e do sêmen fresco foram também avaliadas por HPLC. Não foi constatada diferença significativa (P>0,05) entre os grupos experimentais de ambas as espécies para os parâmetros de cinética espermática e integridade de membrana plasmática e acrossomal. Também não foi observada diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos para redução da peroxidação lipídica. Conclui-se que o processo de criopreservação não desencadeia a peroxidação lipídica da membrana plasmática de espermatozoides caprinos e ovinos independente da adição de Trolox (20 e 40 µM).

Palavras chaves: lipoperoxidação, antioxidantes, sêmen, trolox, caprinos e ovinos

ABSTRACT

With the aim of identify the best method to assess lipid peroxidation in goat and sheep sperm, semen samples were diluted in skimmed milk (Glycerol 7%) and Tris-egg yolk (Glycerol 5%) extenders, respectively, and frozen (-196 °C). After thawing (37°C/30s), samples were analyzed to lipid peroxidation by spectrophotometry and high performance liquid chromatography – DAD (TBARS method) and flow cytometry (C₁₁-BODIPY^{581/591}). It was observed that peroxidation levels obtained by spectrophotometry were significantly higher than those found by HPLC method. C₁₁-BODIPY^{581/591} complemented the data obtained by TBARS (HPLC) method, helping to better understand the results and providing an overview of damaged caused to cells. In conclusion, the dosage method of TBARS by HPLC and C₁₁-BODIPY⁵⁸¹ are more appropriated to assess lipid peroxidation in goat and sheep sperm, and it can be used with success together or separated,. After determine the best method to assess plasma membrane lipid peroxidation of goat and sheep sperm cryopreserved with Trolox, semen samples were diluted in skimmed milk (goat) or tris-egg yolk (sheep) extenders, without antioxidants (control group) or with Trolox at 20 µM or 40 µM/mL. After thawing at 37°C for 30 seconds, samples were submitted to assessment of lipid peroxidation by high performance liquid chromatography (HPLC) and flow cytometry (C₁₁-BODIPY^{581/591}), as well as plasma membrane integrity, acrosomal integrity and sperm kinematics. Semen extenders and fresh semen samples were also assessed by HPLC. No significant difference (P>0.05) was observed among experimental groups of both species to sperm kinematics, plasma membrane and acrosomal integrity. Significant difference also was not observed (P>0.05) among treatment groups to lipid peroxidation reduction. In conclusion, the cryopreservation process did not trigger lipid peroxidation on goat and sheep sperm plasma membrane, independent of Trolox addition (20 e 40 µM).

Keywords: lipid peroxidation, antioxidants, semen, trolox, goats and sheep

INTRODUÇÃO

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos, resultante da ação dos oxidantes sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996).

Os espermatozoides de touros, carneiros e garanhões, por exemplo, são altamente sensíveis ao choque térmico, quando comparados aos de homens e coelhos, que são relativamente resistentes à criopreservação (WATSON, 1995), devido à grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes na sua membrana plasmática. Esta condição torna os espermatozoides dessas espécies mais susceptíveis aos danos peroxidativos (POULOS et al., 1973), por culminar na redução da fluidez da membrana e da sua capacidade fertilizante (AITKEN, 1995).

Pesquisadores têm estudado a adição da vitamina E ao diluente de congelamento do sêmen de carneiros (MAIA et al., 2009), em virtude desta vitamina atuar na proteção das lipoproteínas de baixa densidade presentes na membrana plasmática (KAGAN et al., 1990).

As principais metodologias utilizadas para a avaliação da LPO em sistemas biológicos baseiam-se na dosagem dos produtos gerados durante as diferentes fases deste processo (NICHI, 2003). Dentre estas, a dosagem de componentes oxidados que se mantêm nos fluidos corporais, tais como o malonaldeído (MDA). A reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é a técnica mais utilizada. Nesta reação, o composto formado (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS) pela interação entre o MDA e o TBA pode ser mensurado através de absorvância ou fluorescência (JANERO, 1990).

Todavia, o método de dosagem dos TBARS possui algumas desvantagens, já que não é específico para detecção dos produtos da peroxidação lipídica, uma vez que mensura o somatório de diferentes substâncias que são reativas ao ácido tiobarbitúrico (STEGHENS et al., 2001). Com isso o ensaio de TBA tem sido frequentemente criticado por sua falta de especificidade e formação de artefatos.

Para melhorar a especificidade, vários métodos de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) foram desenvolvidos, baseados na medição direta do MDA (LYKKESFELDT, 2007).

A lipoperoxidação ainda pode ser avaliada através da sonda fluorófora lipofílica C₁₁-BODIPY^{581/591}, análoga de ácidos graxos insaturados, que possui a capacidade de identificar mudanças nas suas propriedades fluorescentes após a peroxidação lipídica. Esta sonda emite fluorescência em vermelho quando intercalada dentro da membrana íntegra, que se altera para a tonalidade laranja (540 nm) após a oxidação pelos peroxinitritos e para a tonalidade verde (520 nm) após ataque à membrana por outros radicais oxidativos (AITKEN et al., 2007).

A introdução de biotécnicas da reprodução na criação de animais de produção possibilitou o seu crescimento em menor período de tempo devido à utilização de sêmen de animais de genética superior. Entretanto, os resultados com o uso de sêmen criopreservado na criação de pequenos ruminantes apresenta resultados aquém dos encontrados na bovinocultura, em decorrência dos danos observados após a criopreservação.

Portanto, a crioconservação de espermatozoides caprinos e ovinos é objeto de estudo para compreensão dos danos ocorridos durante o processo, sendo a lipoperoxidação uma destas alterações. Desta forma, desenvolver e comparar técnicas que sejam de fácil aplicabilidade e de custo acessível na identificação da peroxidação lipídica na célula espermática possibilitarão a busca por alternativas na criopreservação espermática destas espécies, garantindo melhores resultados quando no uso de sêmen pós-descongelação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Membrana Plasmática

A membrana celular desempenha função determinante na arquitetura do sistema biológico e é um elemento estrutural básico para manutenção dos fluidos intracelulares (JEYENDRAN et al., 1984). Todas as células (procariontes ou eucariontes) são circundadas por uma membrana plasmática (MP) que define a sua delimitação, separando seu conteúdo do meio que a circunda. Por servir de barreira seletiva, MP determina a composição do citoplasma celular (COOPER, 1996), e tem papel fundamental na maioria dos fenômenos celulares (SINGER e NICOLSON, 1972).

A MP é organizada por uma bicamada lipídica formada por fosfolipídios e esteróis, além de proteínas integrais e periféricas incrustadas na bicamada ou associadas a ela. As regiões apolares das moléculas dos lipídeos são orientadas para o centro da bicamada, e os grupos polares para a região extracelular ou em contato com o citoplasma, de acordo com o modelo do mosaico fluido, postulado por Singer e Nicolson em 1972 (LEHNINGER et al., 2002; ANDRADE, 2009). O modelo do mosaico fluido tornou-se mais avançado e complexo incluindo conceitos mais recentes, tais como a distribuição lipídica, a assimetria da bicamada (translocases ATP-dependente), polimorfismo dos lipídios e interações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína (PARKS e GRAHAM, 1992; JANUSKAUSKAS et al., 2003).

A MP recobre todo o espermatozoide e, embora seja contínua sobre a superfície dos espermatozoides, a sua natureza difere regionalmente (FLESCHE e GADELLA, 2000). A composição de proteínas das membranas de regiões diferentes varia mais do que a composição de lipídios, refletindo a especialização funcional (SCOTT, 1973).

Na cabeça do espermatozoide, a MP possui dois domínios maiores: região acrossomal e região pós-acrossomal. Na região acrossomal a membrana pode ser subdividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial, sendo que os segmentos marginal e principal, juntos, são denominados de capa acrossomal. No flagelo, observa-se o domínio da peça intermediária, que cobre a bainha mitocondrial e o domínio da cauda posterior, que reveste as peças principal e terminal da cauda (EDDY e O'BRIEN, 1994).

A MP da cabeça do espermatozoide é separada da MP da peça intermediária pelo anel posterior, enquanto a membrana da peça intermediária é separada da membrana do flagelo pelo

anel anular. Estes diferentes domínios contém variadas concentrações e distribuições de partículas intramembranasos (FLESCHE e GADELLA, 2000).

Os fosfolipídios, cujas cadeias de ácidos graxos são predominantemente poliinsaturadas, quando submetidos à redução da temperatura assumem uma forma cônica, na qual as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas. Essa estrutura é denominada de forma “hexagonal II” ou micela invertida. Quando a membrana encontra-se na transição da fase fluida para a fase cristalina, para muitos lipídios, a formação dessa micela invertida é transitória; entretanto, para certos fosfolipídios esta estrutura persiste. Como consequência, observa-se o aumento da permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana, causando danos irreparáveis e perda de viabilidade (AMANN e PICKET, 1987; PARKS e GRAHAM, 1992; WATSON, 1995).

As alterações de membrana podem variar de mudança na organização, fluidez, permeabilidade e composição lipídica da bicamada à total ruptura de membrana (JANUSKAUSKAS et al., 2003). Alterações na estrutura e na integridade da membrana plasmática parecem ser um importante componente associado com a redução da fertilidade dos espermatozoides pós-descongelamento (THOMAS et al., 2006). Com isso, a baixa fertilidade do sêmen congelado é atribuída, em grande parte, às alterações sofridas na estrutura das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial durante a refrigeração, congelamento e descongelamento (PARKS e GRAHAM, 1992).

Portanto, a membrana plasmática representa um importante papel na capacidade fertilizante dos espermatozoides, modificando-se ao longo do processo de espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino e, finalmente, capacitação e penetração no oócito (HOLT, 1995; WATSON, 1995; LENZI et al., 1996). Por isso esta estrutura deve apresentar-se íntegra, física e funcionalmente, para que a célula tenha viabilidade e capacidade fertilizante (PARKS e GRAHAM, 1992; KUMI-DIAKA, 1993). Desta forma, são necessários maiores conhecimentos biofísicos desta estrutura celular, visando propor soluções para aumentar a sobrevivência dos espermatozoides após a criopreservação (HOLT, 2000).

2.2 Espécies reativas ao oxigênio (ROS)

As espécies reativas ao oxigênio (ROS) são moléculas e radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989) altamente reativas, que possuem um elétron desemparelhado (STRYER, 1996), e, que quando produzidas em excesso (desequilíbrio entre a produção e eliminação) (ALVAREZ et al., 1987), induzem danos aos fosfolipídios e ao DNA dos espermatozoides de homens, por exemplo, estando envolvidos na infertilidade masculina (OLLERO et al., 2001).

Estes produtos do metabolismo celular desencadeiam o processo de peroxidação lipídica, que determina a diminuição da motilidade e da viabilidade espermática, além de causar danos ao acrossoma e ao potencial de membrana mitocondrial (BAUMBER et al., 2000), sendo exemplo de danos oxidativos às membranas celulares, lipoproteínas e outras estruturas que contém componentes lipídicos, além de acompanhar diversos processos degenerativos (GIROTTI, 1998). Em cavalos, touros, e homens, altas concentrações de ROS levam a redução do metabolismo energético, da motilidade e da viabilidade (ARMSTRONG et al., 1999; BAUMBER et al., 2002; BILODEAU et al., 2002).

Dentre as ROS mais importantes estão o radical hidroxila (OH^\cdot), o ânion superóxido (O_2^\cdot), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO_2) destacando o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio como as principais ROS observadas no sêmen, resultado do metabolismo celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Fisiologicamente as ROS se formam durante a respiração mitocondrial, e anormalidades na mitocôndria podem contribuir para sua produção excessiva (AL-ABDULLA e LEE, 1998; THANNICKAL e FANBURG, 2000).

Durante a criopreservação ocorre estresse associado às diferenças de temperatura a que as células são submetidas, além dos efeitos dos componentes do meio e dos crioprotetores durante o processamento, assim como os efeitos da descongelamento (VISHWANATH e SHANNON, 2000). Além disso, os espermatozoides danificados pelo processo de congelamento geram uma maior quantidade de ROS do que aqueles morfologicamente normais (BALL et al., 2001).

Sabe-se que as ROS apresentam uma dupla função na fertilidade, sendo de fundamental importância em processos como hiperativação da motilidade, capacitação, reação acrossômica e fertilização. Todavia, podem causar danos severos aos espermatozoides, quando os seus mecanismos de defesa encontram-se reduzidos. Por conseguinte, a produção controlada de ROS é importante para manutenção de suas funções normais, enquanto sua superprodução e/ou defesa

antioxidante reduzida levam ao estresse oxidativo, resultando em baixa fertilidade (AITKEN, 1995).

2.3 Peroxidação Lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica é definida como “a deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados”, sendo estes últimos classificados como aqueles que contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono ($H^2C=CH^2$), que se tornam excelentes alvos para o ataque de radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG e ARNÉR, 2001).

Basicamente, a LPO consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado (AGPI) para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH), como produto primário inicial. O processo de LPO ocorre em diversas etapas e com inúmeras possibilidades de reações químicas, o que a torna de difícil compreensão e avaliação (LIMA e ABDALLA, 2001).

Em suma, a peroxidação é uma reação em cadeia, subdividida nas etapas de iniciação, propagação e terminação, de modo que a iniciação da lipoperoxidação é ocasionada pelo ataque ao lipídio por qualquer ROS que tenha reatividade suficiente para sequestrar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-CH_2-$). Por outro lado, o término deste processo é marcado pela propagação dos radicais lipídicos e peroxila ($R-C$ e $-ROO$) produzidos, até que destruam a si próprios, sendo o radical hidroxila reconhecido como a ROS iniciadora da peroxidação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A peroxidação lipídica parece ser uma causa particularmente importante de disfunção espermática. Isto porque a membrana espermática sendo rica em ácidos graxos poliinsaturados, que, em concentração elevada, determinam fluidez da membrana possibilitando que o espermatozoide participe dos eventos de fusão de membranas durante a fertilização, torna estes gametas mais susceptíveis a LPO. Por conseguinte, espermatozoides com LPO apresentam redução da fluidez da membrana e da sua capacidade de fertilização (AITKEN, 1995).

Alterações da fase lipídica e/ou aumento na LPO da membrana plasmática têm como consequência redução na velocidade e na porcentagem de espermatozoides móveis (WATSON, 1995; ISACHENKO et al., 2004). Além disso, são observadas mudanças no volume de água intracelular, que resultam em estresse mecânico nas membranas (NOILES et al., 1995), desestabilização da bicamada lipídica da membrana plasmática e modificações dos componentes

da membrana celular, como desnaturação de proteínas da membrana, além de alterações no metabolismo energético celular, da osmolaridade ou do pH (WATSON, 2000).

Torna-se visível então a existência de uma correlação entre a lipoperoxidação do sêmen com motilidade e morfologia espermática, o que pode ser controlado ou mesmo revertido por intermédio da ação dos antioxidantes, os quais podem ser adicionados aos meios diluidores, a fim de manter o equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes (MAIA, 2006).

2.4 Antioxidantes

Atualmente existe um grande interesse nos estudos dos antioxidantes, devido às descobertas sobre o efeito das ROS no organismo. Os antioxidantes são moléculas ou substâncias capazes de converter as ROS em água, com a finalidade de prevenir a sua superprodução (AGARWAL et al., 2005).

Na tentativa de minimizar os danos ocasionados aos espermatozoides pela LPO, diversos testes utilizando diferentes antioxidantes tem sido utilizados (MAXWELL e STOJANOV, 1996). Alguns estudos já demonstraram que os antioxidantes exercem um efeito protetor sobre a membrana plasmática dos espermatozoides criopreservados, sendo capazes de manter a atividade metabólica e a viabilidade celular (BECONI et al., 1993).

Os agentes antioxidantes podem atuar por meio de dois sistemas: enzimático e não-enzimático (SIES e STAHL, 1995). Os espermatozoides das espécies animais possuem um sistema intracelular que consiste, principalmente, das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e redutase (GPr), bem como os antioxidantes não enzimáticos ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol ou vitamina E (AITKEN, 1995).

Os antioxidantes agem de diferentes formas na proteção do organismo: 1) atuam impedindo a formação de ROS; 2) interceptam as ROS produzidas pelo metabolismo celular ou fontes exógenas, impedindo que ataquem os lipídeos, aminoácidos, as duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases de DNA; 3) reparam lesões, processo relacionado à remoção de danos ao DNA e reconstituição das membranas celulares danificadas (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Entretanto, a utilização destes suplementos em meios para criopreservação, visando melhorar a qualidade dos espermatozoides, vem gerando resultados bastante contraditórios,

demonstrando a necessidade da realização de mais pesquisas a respeito dos seus efeitos no sêmen.

2.4.1 Vitamina “E” e Trolox

O α -tocoferol, ou vitamina E, é uma substância lipossolúvel conhecida como inibidora da peroxidação lipídica (BREININGER et al., 2005) e, assim como a vitamina C, protege os espermatozoides contra danos oxidativos do DNA e da membrana (SIKKA, 1996). Atualmente, a vitamina E é um termo genérico para todos os seus tocoferóis e derivados, tendo a atividade biológica o α -tocoferol (TRABER e PACKER, 1995; TRABER e SIES, 1996).

Na natureza, oito substâncias foram encontradas com atividades da vitamina E, as quais são - α , - β , γ - e Δ - tocoferol, e α -, - β , γ - e δ - tocotrienol. Estas substâncias estão localizadas na interface aquosa e nos domínios hidrofílicos das membranas biológicas e lipoproteínas (QUINN, 2004), protegendo as membranas celulares através de sua ação antioxidante e pela formação de complexos com os fosfolipídios para estabilização das membranas através de ligações de “Van der Waals” (BRADFORD et al., 2003).

Por conseguinte, a vitamina E atua como captador de radicais livres e reparador de membranas (MACHLIN, 1984), além de diminuir a peroxidação lipídica pela manutenção das concentrações de superóxido dismutase (BECONI et al., 1991). Desta forma, este antioxidante possui duas funções importantes na célula, as quais consistem em sua ação antioxidante e, que evita danos aos tecidos compostos por lipídios insaturados, através da remoção de radicais de oxigênio ativo (MUKAI, 1993), bem como oxigênio singlet (FUKUZAWA et al., 1997), além da função de estabilizar a estrutura das membranas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

No que diz respeito à sua utilização na criopreservação, quando adicionado ao meio de congelamento de sêmen, em espermatozoides bovinos, por exemplo, preservam a atividade metabólica e viabilidade celular (O’FLAHERTY et al., 1997), e em ovinos proporcionam melhor integridade ultraestrutural (membrana plasmática e mitocondrial) e cinética espermática (SILVA et al., 2013). Entretanto, o α -tocoferol pode agir como um pró-oxidante em determinadas concentrações e em curto período (SEN et al., 2006).

E vem-se utilizando antioxidantes hidrossolúveis, como o 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico, posteriormente denominado de Trolox[®]C (CORT et al., 1975),

análogo sintético hidrossolúvel do α -tocoferol (BARCLAY et al., 1995), que é indicado como um excelente protetor contra a peroxidação lipídica (SCOTT et al., 1974).

O Trolox foi sintetizado por Scott e sua equipe em 1974, e indicado como antioxidante para a preservação de óleos e gorduras. Esta substância apresenta propriedades antioxidantes, eficazes tanto em gordura animal quanto vegetal, característica que o torna particular, já que o tocoferol tem pouca atividade na prevenção da peroxidação de óleos vegetais (SCOTT et al., 1974), sendo sua atividade antioxidante em óleos vegetais e gordura animal maior que a do α e γ -tocoferol (CORT et al., 1975), mas o mecanismo de ação para o efeito antioxidante do Trolox é semelhante ao da vitamina E.

2.5 Métodos para Avaliação da Peroxidação Lipídica

2.5.1 Espectrofotômetro e Cromatografia líquida de alta performance

A LPO é resultado da ação deletéria aos lipídios espermáticos, e a sua avaliação é essencial para observar a integridade da célula. Em espermatozoides são acumulados progressivamente, os hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática espermática, que, posteriormente, se decompõe para formar o malonaldeído (MDA). O MDA é um dos produtos secundários mais conhecidos da LPO e pode ser utilizado em biomaterias, como indicador de lesão à membrana (ESTERBAUER et al., 1991).

Os principais métodos utilizados para avaliação da LPO mensuram a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo. Em decorrência disto, entre os diferentes métodos analíticos estabelecidos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é a técnica mais utilizada (JANERO, 1990). O MDA em condições apropriadas de incubação (meio ácido e aquecimento), reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível (JANERO, 1990; BENZIE, 1996).

Para medição do composto formado a partir do MDA com o TBA, utiliza-se espectrofotômetro (OHKAWA et al., 1979), determinados por absorção no visível (532 nm) ou por fluorescência ($\lambda_{exc} = 515$ nm e $\lambda_{em} = 553$ nm) (JANERO, 1990), onde os resultados

geralmente são correlacionados com medições a partir de MDA puro (hidrólise ácida de 1,1,3,3-tetrahidroxipropano, TEP) (CANDAN e TUZMEN, 2008).

No entanto, os resultados obtidos nos testes de medição do cromóforo vermelho após reação com o TBA são bastante variados, de acordo com as diferentes condições em que os ensaios foram realizados (LYKKESFELDT, 2007), sendo considerado um método de baixa seletividade e sensibilidade, que pode ser melhorado com o uso de análises por cromatografia líquida de alta performance, com detecção UV ou fluorescente (AGARWAL e CHASE, 2002).

Desta forma, na tentativa de melhorar a especificidade do método espectrofotométrico, foi desenvolvido um método de HPLC para isolamento e medição do composto MDA:TBA (BIRD et al., 1983). Sendo a cromatografia um método físico-químico de separação de misturas que se fundamenta na migração diferencial dos componentes de uma mistura, o que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, sendo uma fase fixa que tem uma grande área superficial chamada fase estacionária, e outra um fluido que se move através da fase estacionária, sendo chamada de fase móvel (LANÇAS, 1993).

2.5.2 C₁₁-BODIPY^{581/591}

O C₁₁-BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a-ácido4a-diaza-s-indaceno-3-undecanóico), é uma sonda fluorescente de membrana, cuja fluorescência altera de vermelho para verde, irreversivelmente, quando as células são expostas às ROS (PAP et al., 1999), tratando-se de uma enzima de oxidação fluorescente, análoga de ácidos graxos, que é facilmente incorporada à membrana (DRUMMEN et al., 2002).

Devido à necessidade de se utilizar grande quantidade de material para determinação precisa da lipoperoxidação em uma amostra, um ensaio de fluorescência foi criado para detectar a formação de peróxidos lipídicos, que tem tido sucesso quando utilizado para analisar células espermáticas de touros, suínos e garanhões, sendo considerada um método mais confiável e fácil para avaliar a LPO (NAGUIB, 1998; BALL e VO, 2002; BROUWERS e GADELLA, 2003; CHRISTOVA et al., 2004; BROUWERS et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral: Estudar a peroxidação lipídica da membrana de espermatozoides obtidos de pequenos ruminantes e submetidos à criopreservação com Trolox.

3.2. Objetivos específicos:

- 1) Avaliar, através das técnicas de espectrofotômetro e HPLC-DAD pelo ensaio com TBA, e C₁₁-BODIPY^{581/591} (fluorescência) por citometria de fluxo, a lipoperoxidação da membrana de espermatozoides (*in natura* e criopreservados), obtidos de pequenos ruminantes;
- 2) Estudar o efeito da adição do Trolox ao diluidor de congelamento de sêmen sobre a peroxidação lipídica da membrana de espermatozoides criopreservados;
- 3) Desenvolver um protocolo de rotina para avaliar a lipoperoxidação espermática em laboratório.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL R, CHASE SD. Rapid fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 775, p. 121–126, 2002.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A.; SAID, T.M. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, p. 654-660, 2005.

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659- 68, 1995.

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

AL-ABDULLA, A.N.; LEE, J.M. Apoptosis of retrogradely degenerating neurons occurs in association with the accumulation of perikaryal mitochondria and oxidative damage to the nucleus. **American Journal of Physiology**, v. 153, p. 447-456, 1998.

ALVAREZ, J.G.; TOUCHSTONE, J.C.; BLASCO, L.; et al. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**, v. 8, p. 338-348, 1987.

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

ANDRADE, A.F.C. **Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozóides criopreservados de equinos. 2009.** 132 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W. et al. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p. 869-880, 1999.

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 508-515, 2001.

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

BARCLAY, L.R.C.; ARTZ, J.D.; MOWAT, J.J. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox[®], between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: ¹⁴C tracer and product studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1237, p. 77-85, 1995.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 895-902, 2000.

BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p.1025-1033, 2002.

BECONI, M.T.; AFFRANCHINO, M.A.; SCHANG, L.M. et al. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, v. 23, p. 545–553, 1991.

BECONI, M.T. ; FRANZIA, C.R.; MORA, N.G.; AFFRANCHINO, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p. 841-851, 1993.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal Food Sciences & Nutrition**, v. 47, p. 233-261, 1996.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRAD, M-A. 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**, v.57, p.1105-1122, 2002.

BIRD, R.P.; HUNG, S.O.S.; HADLEY, M.; DRAPER, H.H. Determination of malondialdehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 128, p. 240–244, 1983.

BRADFORD, A.; ATKINSON, J.; FULLER, N. et al. The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies. **Journal Lipid Research**, v. 44, p. 1940-1945, 2003.

BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; O’FLAHERTY, C.M.; et al. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 2126-2135, 2005.

BROUWERS, J.F.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1382–1391, 2003.

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

CANDAN, N.; TUZMEN, N. Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography – fluorescence detection. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 709-713, 2008.

COOPER, G.M. The cell: a molecular approach. **Washington: ASM Press**, 1996. 673p.

CORT, W.M.; SCOTT, J.W.; ARAUJO, M.; et al. Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. **Journal of the American Oil Chemist's Society**. v. 52, p. 174-178, 1975.

CHRISTOVA, Y.; JAMES, P.S.; JONES, R. Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, p. 365–372, 2004.

DRUMMEN, G.P.; VAN LIEBERGEN L.C.M.; OP DEN KAMP J.A.F., et al. C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical Biology & Medicine**. v.33, p.473–490, 2002.

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994, p. 29-77.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J., ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, p. 81–128,1991.

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

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FUKUZAWA, K.; MATSUURA, K.; TOKUMURA, A. et al. Kinetics and dynamics of singlet oxygen scavenging by α -tocopherol in phospholipid model membranes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 923-930, 1997.

GIROTTI A.W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **The Journal of Lipid Research**. v. 39, p. 1529-1542, 1998.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 2ed. Oxford: University Press, p. 543, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed. New York: Oxford University Press. 1999. 936p.

HOLT, W.V. The sperm plasma membrane. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HUMAN SPERM ACROSSOME REACTION, PHYSIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL INDUCTION AND TRANSDUCTION PATHWAYS, 1995, France. **Proceedings...** France, 1995 .

HOLT W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; KATKOV, I.I. et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. **Human Reproduction**, v. 19, p. 932-939, 2004.

JANERO, D.J. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity indices of lipid peroxidation and peroxidative injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PALAEZ M. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Infertility**. v. 70, p. 219-225, 1984.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758 , 2003.

KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; PACKER, L. Recycling and antioxidant activity of tocopherol homologues of differing hydrocarbon chain length in liver microsomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 282, p. 221-225, 1990.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v. 39, p. 1279-1289, 1993.

LANÇAS, F.M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254p.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Membranas biológicas e transporte. In: Lehninger, A.L. **Princípios da bioquímica**. São Paulo: Sarvier. cap. 12, p. 301-339, 2002.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v. 2, p. 246-256, 1996.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 293-303, 2001.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**, v. 380, p. 50–58, 2007.

MACHLIN, L. J. **Vitamin E Handbook of vitamins: nutritional, biochemical, and clinical aspects**. New York: Marcel Dekker, 1984. 245 p.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OE), trolox-C e catalase**. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C. et al. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, v. 85, p. 85-90, 2009.

MAXWELL, W.M.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction Fertility and Development**, v. 8; p. 1013-1020, 1996.

MUKAI, K. Synthesis and kinetic study of antioxidant and prooxidant actions of vitamin E derivatives. In: PACKER, L.; FUCHS, J. **Vitamin E in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 320 p. 1993.

NAGUIB, Y.M. A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 265, p. 290–298, 1998.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003, 101f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

NOILES, E.E.; BAILEY, J.L.; STOREY, B.T. Temperature dependence of the water permeability, L_p , of murine sperm shows a discontinuity between 4° and 0°C. **Cryobiology**, v. 32, p. 220-238, 1995.

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

O'FLAHERTY, C.M.; BEORLEGUI, N.B.; BECONI, M.T. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 29, p. 269-275, 1997.

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

OLLERO, M.; GIL-GUZMÁN, E.; LÓPEZ, M.C.; et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. **Human Reproduction**, v. 16, p. 1912- 1921, 2001.

PAP, E.H.W.; DRUMMEN, G. P. C.; WINTER, V. J.; et al. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY(581/591). **FEBS Letters**, v. 453, p. 278-282, 1999.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 46, p. 541-549, 1973.

QUINN, P.J. Is the distribution of α -tocopherol in membranes consistent with its putative functions. **Biochemistry**, v. 69, p. 58-66, 2004.

SEN, C.K.; KHANNA, S.; ROY, S. Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. **Life Science**. v. 78, p. 2026-2032, 2006.

SCOTT, T.W. Lipid metabolism of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl v. 18, p. 65-76, 1973.

SCOTT, J.W.; CORT, W.M.; HARLEY, H.; et al. 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 51, p. 200-203, 1974.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SIKKA, S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 78-86, 1996.

- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; et al. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Animal Reproduction Science** v. 137, p. 37–44, 2013.
- SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720-31, 1972.
- STEGHENS, J.P.; KAPPEL, A.L.V.; DENIS, I.; et al. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 242-249, 2001.
- STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1996. 408p.
- THANNICKAL, V.J.; FANBURG, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology**, v. 279, p. L1005-L1028, 2000.
- THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology** . v.65, p. 1531–1550, 2006.
- TRABER, M.G.; PACKER, L. Vitamin E: beyond antioxidant function. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62 (6 Suppl), p. 1501S–1509S, 1995.
- TRABER, M.G.; SIES, H. Vitamin E in humans: demand and delivery. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 321–347, 1996.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**. v. 62, p. 23-53, 2000.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE CAPRINOS E OVINOS

L.C.P. ARRUDA¹, G.R. SILVA², A.M. BATISTA¹, R.A.J.A. SILVA¹, I.H.A.V. NERY¹,
T.M.S. SILVA², M.M.P. GUERRA¹.

- 1- Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n. Dois Irmãos, Recife, PE. CEP: 52171-900, Brasil.
- 2- Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica (BIOFITO), Departamento de Ciências Moleculares – UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n. Dois Irmãos, Recife, PE. CEP: 52171-900, Brasil.

RESUMO

Objetivando identificar o melhor método para avaliar a peroxidação lipídica em espermatozoides criopreservados de caprinos e ovinos, amostras de sêmen foram diluídas em leite desnatado (Glicerol 7%) e Tris-gema de ovo (Glicerol 5%), respectivamente, e congeladas (-196 °C). Após descongelação (37 °C/30s), as amostras foram submetidas à avaliação da peroxidação lipídica por espectrofotometria (UV-Visível), cromatografia líquida de alta performance acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) pelo ensaio do TBARS e citometria de fluxo (C₁₁-BODIPY^{581/591}). Observou-se que as concentrações de malonaldeído obtidas por espectrofotometria foram significativamente maiores que as encontradas pelo método de HPLC. Ensaio com a sonda C₁₁-BODIPY^{581/591} complementaram os dados obtidos pelo ensaio do TBARS (HPLC), o que permitiu melhor compreensão dos resultados, por evidenciar os danos ocorridos às células. Conclui-se que o método de dosagem de TBARS pelo HPLC e o do C₁₁-BODIPY^{581/591} são os mais indicados para avaliação da peroxidação lipídica em espermatozoides de caprinos e ovinos, podendo ser utilizados em associação ou isoladamente.

Palavras-chave: lipoperoxidação, sêmen, HPLC-DAD, C₁₁-BODIPY^{581/59}, espectrofotômetro (UV-Visível), ruminantes.

ABSTRACT

With the aim of identify the best method to assess lipid peroxidation in goat and sheep sperm, semen samples were diluted in skimmed milk (Glicerol 7%) and Tris-egg yolk (Glicerol 5%),

respectively, and frozen (-196 °C). After thawing (37°C/30s), the samples were analyzed to lipid peroxidation by spectrophotometry (UV-Visible), high performance liquid chromatography coupled with diode-array detector (HPLC-DAD) by TBARS assay and flow cytometry (C₁₁-BODIPY^{581/591}). It was observed that peroxidation levels obtained by spectrophotometry were significantly higher than those found by HPLC method. Assays with C₁₁-BODIPY^{581/591} probe complemented the data obtained by TBARS (HPLC) method, helping to better understand the results and providing an overview of damaged caused on the cells. In conclusion, the dosage method of TBARS by HPLC and C₁₁-BODIPY⁵⁸¹ are more appropriated to assess lipid peroxidation in goat and sheep sperm, and it can be used with success together or separated.

Keywords: lipid peroxidation, semen, HPLC-DAD, C₁₁-BODIPY^{581/59}, spectrophotometer (UV-Visible), ruminants.

INTRODUÇÃO

Todos os componentes celulares são susceptíveis à ação das espécies reativas ao oxigênio (ROS), especialmente a membrana plasmática, devido à peroxidação lipídica que causa danos à sua estrutura e permeabilidade (MELLO FILHO et al., 1984). Nos espermatozoides, os ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana são importantes na manutenção da fluidez e flexibilidade durante a fertilização (LONG e KRAMER, 2003).

Os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) são acumulados progressivamente na membrana plasmática dos espermatozoides, e posteriormente, se decompõem para formar o malonaldeído (MDA). Desta forma, a peroxidação lipídica é o resultado da ação deletéria das ROS aos lipídios espermáticos, e a sua avaliação é essencial para observar a integridade da célula (ESTERBAUER et al., 1991), pois espermatozoides com lipoperoxidação apresentam redução da fluidez da membrana e da sua capacidade de fertilização (AITKEN, 1995).

As análises de ocorrência da peroxidação lipídica geralmente são realizadas pela reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), onde se mensura a concentração de um cromógeno rosa (532nm) (BERNHEIM et al., 1948; PRYOR, 1980), cuja formação depende da presença do MDA (SINNHUBER et al., 1958) produzido em maior quantidade pela oxidação secundária de ácidos graxos poli-insaturados em fluídos corporais e tecidos (PRYOR et al., 1976).

Entretanto, apesar do método TBA ser mais amplamente utilizado, por sua simplicidade, sensibilidade e custo razoável, não é específico para a dosagem de MDA em amostras biológicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1981; KIKUGAWA et al., 1988), uma vez que uma série de outros compostos podem ter a mesma absorvância (532nm) (PORTER, 1976).

Na tentativa de superar esta falta de especificidade, vários pesquisadores têm desenvolvido métodos de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), com base no teste do TBA (BIRD et al., 1983; LI et al., 2004; CANDAN e TUZMEN, 2008). Ressalta-se ainda, o uso de outros métodos, como o ensaio de fluorescência para detectar a formação de peróxidos lipídicos, que depende da sensibilidade do fluoróforo C11-BODIPY^(581/591) à oxidação por radicais (peroxila e alcoxila) (DRUMMEN et al., 2002).

Desta forma, com o objetivo de identificar o melhor método para avaliar a ocorrência da peroxidação lipídica em espermatozoides criopreservados de caprinos e ovinos, foram utilizados os métodos de espectrofotometria (UV-Visível) e HPLC-DAD, baseados no ensaio do TBARS, e o C11-BODIPY^(581/591) por citometria de fluxo.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes:

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma–Aldrich Company (St. Louis, MO, USA), com exceção do ácido 2-tiobarbitúrico (MERCK, Darmstsd, Germany), Hidróxido de potássio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Hidróxido de sódio (NUCLEAR, Diadema, SP, Brasil), Metanol (CARLOS ERBA, Val-de-Reuil, França).

Animais:

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos e seis reprodutores ovinos, os quais foram submetidos à avaliação clínica e andrológica para comprovação da higidez e possibilidade de participar do delineamento experimental, de acordo com os padrões mínimos recomendados (MIES FILHO, 1982). Os animais foram alocados em baias, recebendo dieta à base de feno de capim tifton, ração peletizada, além de sal mineral e água *ad libitum*.

Colheita e análise do sêmen:

Os ejaculados foram colhidos pelo método de vagina artificial, usando uma fêmea como manequim. Imediatamente após a colheita, as amostras de sêmen foram submetidos à análise microscópica [movimento de massa (≥ 3), motilidade (0,0-100,0%), e vigor (≥ 3) espermático], em microscópio de contraste de fase (Olympus Optical Co., Ltda., Tokyo, Japan). Foram selecionados animais cujos ejaculados apresentaram valores mínimos de 70,0% de motilidade e 3 de vigor (MIES FILHO, 1982).

- Caprinos:

As colheitas de sêmen foram realizadas a cada 48h, sendo obtido um ejaculado de cada animal a cada colheita, sendo realizadas um total de cinco colheitas. Após análise e aprovação de cada um dos ejaculados dos cinco animais, de cada dia de colheita, procedeu-se a formação do *pool* dos ejaculados para posterior diluição. A determinação da concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer.

As amostras de sêmen caprino foram submetidas à lavagem [centrifugação a 1200rpm/10min, 2vezes, com Tris (3,605 g de Tris-hidroximetilaminometano, 2,024 g de ácido cítrico, 1,488 g de frutose e 100 mL de água miliQ; pH 6,8)] para retirada do plasma seminal. Em seguida, o *pellet* foi diluído com Leite desnatado (Glicerol 7%).

- Ovinos:

As colheitas de sêmen foram realizadas a cada 48h, sendo obtido um ejaculado de cada animal a cada colheita, sendo realizadas um total de seis colheitas. Após análise e aprovação de cada um dos ejaculados dos seis animais, de cada dia de colheita, procedeu-se a formação do *pool* dos ejaculados para posterior diluição. A determinação da concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer.

Uma vez que as amostras de sêmen ovino não precisam ser lavadas para retirada do plasma seminal, procedeu-se imediatamente a diluição em Tris-gema de ovo (Glicerol 5%).

Congelação:

Após diluição, as amostras de sêmen correspondentes aos grupos experimentais foram envasadas em palhetas (0,25 mL; 50×10^6 espermatozoides) e processadas em máquina de congelação de sêmen (modelo TK 3000, TK tecnologia em Congelação Ltda, Brasil), utilizando a seguinte curva de congelação (-0,25 °C/min até atingir 5 °C, após estabilização por 2h, em seguida -20 °C/min até -120 °C). Imediatamente após a congelação as palhetas foram

transferidas para o nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenadas em botijão criobiológico. A descongelação de 2 palhetas de sêmen de cada espécie foi realizada em banho-maria (37 °C, 30s) e alíquotas dessas amostras foram avaliadas quanto à peroxidação lipídica.

Análise da Peroxidação Lipídica:

Preparo de soluções:

As soluções de trabalho foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Candan e Tuzmen (2008) com modificações. Preparou-se uma solução de Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) à 40mM, onde 576,0g de TBA foi solubilizado em 80,0mL de água e, em seguida, aquecido à 55°C por 30min em banho-maria. Após atingir a temperatura ambiente completou-se com água para o volume de 100,0mL. Uma alíquota de 1,3mL de Ácido fosfórico (H₃PO₄) foi diluído em 50,0mL de água para obter uma solução à 440mM. Preparou-se uma solução estoque de Tetrametoxipropano (TEP) a 1mM, diluindo-se 16,6μL em 100mL de ácido sulfúrico 1,0%. Uma mistura de Metanol (MeOH) e Hidróxido de sódio (NaOH) 1,0M na proporção 91:9 foi utilizada como agente de precipitação. Para o preparo da solução tampão de Fosfato de potássio (KH₂PO₄) à 50mM, 6,8g do sal foi solubilizado em 1,0L de água e o pH ajustado para 6,2 com Hidróxido de potássio (KOH).

Curva Padrão:

Preparou-se uma curva padrão utilizando o TEP, de acordo com metodologia descrita por Candan e Tuzmen (2008), com modificações, onde uma alíquota (2mL) de solução estoque de TEP foi diluída em 50mL de ácido sulfúrico para obter uma concentração de 40nmol/mL de TEP (solução de trabalho), e a partir da solução de trabalho foi diluído (diluição seriada) em água para as concentrações de 10; 5; 2,5; e 0,625 nmol/mL e incubados por 2h a temperatura ambiente. A 500μL de cada um dos padrões foram adicionados 750μL de H₃PO₄ (440mM) e 50μL de TBA (40mM), a seguir, a mistura foi aquecida por 1h a 100 °C a fim de ocorrer a reação de derivatização. Após atingirem a temperatura ambiente, foi retirada uma alíquota (500μL) dos padrões e misturada a 500μL do reagente de precipitação [MeOH:1 M NaOH (91:9)]. As amostras foram então filtradas em filtro de membrana (0,22μM) e avaliadas.

- Espectrofotômetro:

Uma alíquota (400 μ L), de cada um dos padrões foi retirada para análise no espectrofotômetro (UV-Visível), utilizando um analisador bioquímico semi-automático (Bioplus, modelo BIO-2000). A detecção do aduto foi realizada em um comprimento de onda de 532nm. Todas as amostras foram preparadas e analisadas em triplicata. As concentrações de malonaldeído foram expressas em nmol/mL.

- HPLC:

Uma alíquota (400 μ L) de cada um dos padrões foi colocada em um “vail” para injeção no aparelho de HPLC (Shimadzu Prominence, modelo LC-20AT), equipado com detector de arranjo de diodo (SPDM 20), forno da coluna (CTO-20AC), autoinjeter (SIL-20A), duas bombas (LC-6AT), degaseificador (DGU-20As) e módulo de comunicação (CBM-20A) controlado pelo software LC-Solution.

Para as separações cromatográficas utilizou-se a coluna Rexchorm S5-100-ODS (150mmx4,6mm I.D. 5 μ m 100Å) à uma temperatura de 30 °C e coluna de guarda Security Guard Catridge Holder C18 (4x3.0mm), utilizando como fase móvel uma solução tampão de metanol-fosfato de potássio (50mM, pH=6.8; 40:60, v/v), a qual foi previamente filtrada em filtro de membrana (0,45 μ m; Millipore, Bedford, MA) e injetada em condição isocrática, com uma taxa de fluxo de 0.6 mL/min.

Os cromatogramas foram registrados em um comprimento de onda fixado em 532nm. O tempo de corrida foi 8 min, e o volume de injeção da amostra de 10 μ L. Todas as amostras foram preparadas e analisadas em triplicata. As concentrações de malonaldeído foram expressas em nmol/mL.

Após a análise foram obtidas as seguintes curvas de calibração (Figura 1 e 2):

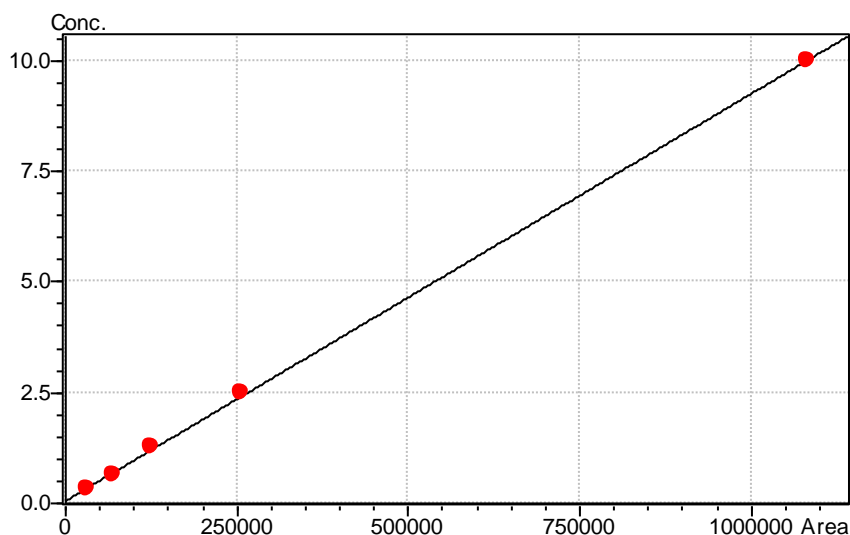


Figura 1. Curva padrão gerada pelos padrões de TEP, mostrando a correlação entre a área de pico e as concentrações de MDA (HPLC-DAD). Coeficiente de correlação para a linha de regressão foi $r=0.9998$ para as concentrações entre 0,625 e 10nmol/mL.

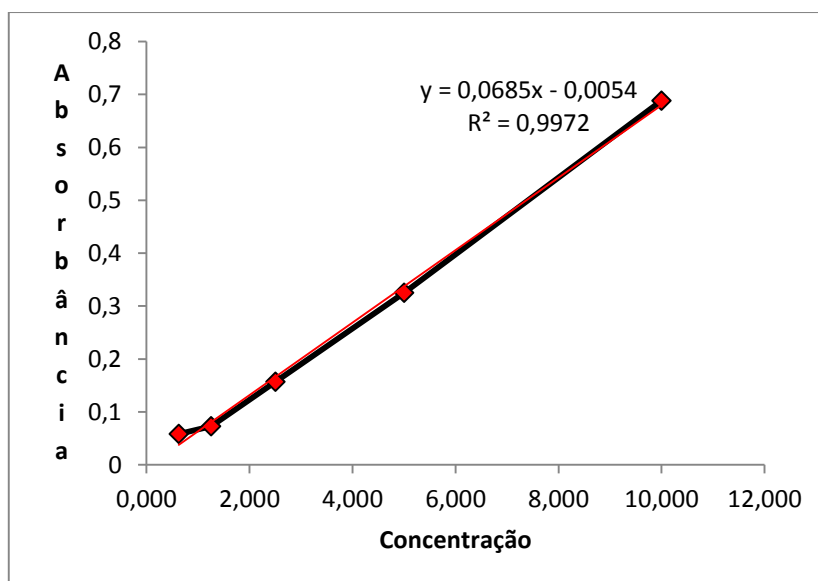


Figura 2. Curva padrão gerada pelos padrões de TEP, mostrando a correlação entre a absorvância e as concentrações de MDA (Espectrofotômetro- UV-Visível). Coeficiente de correlação para a linha de regressão foi $r=0.9972$ para as concentrações entre 0,625 e 10nmol/mL.

Após a obtenção das curvas padrão, procedeu-se às análises das amostras de sêmen caprino e ovino, submetidos à congelação/descongelação.

Análise da peroxidação lipídica nas amostras de sêmen

As amostras de sêmen foram preparadas segundo metodologia descrita por Candan e Tuzmen (2008), com modificações, onde em um tubo de vidro com tampa foi adicionada uma alíquota (200µL) de sêmen, 750µL de H₃PO₄ (440mM) e 50µL de TBA (40mM). Essa mistura foi aquecida por 1h a 100 °C, e após atingirem a temperatura ambiente, foi retirada uma alíquota (500µL), colocada em tubo de microcentrífuga, a qual foi adicionado 500µL do reagente de precipitação [MeOH:1 M NaOH (91:9)]. A seguir, as amostras foram centrifugadas (13000rpm por 5 min) e retirado o sobrenadante que foi filtrado em filtro de membrana (0,22 µm).

Uma alíquota (400µL) do sobrenadante foi colocada em tubo de microcentrífuga para análise no espectrofotômetro (UV-Visível) e outra alíquota (400µL) foi colocada em um “vail” para injeção no aparelho de HPLC-DAD e analisadas como descrito anteriormente.

Método de Imunofluorescência

C₁₁-BODIPY^{581/591}

Para análise da peroxidação lipídica através da sonda fluorescente C₁₁-BODIPY^{581/591} [4,4- difluoro -5-(4-phenyl-1,3-butadienyl) -4- bora -3a, 4a-diaza-s-indacene -3-undecanoic acid; InvitrogenTM, Eugene, Oregon, USA], descongelou-se 1 palheta de sêmen a 37 °C por 30 s, os quais foram centrifugados duas vezes em PBS (Fosfato Salino Tamponado), a 1500rpm por 5 min. A seguir, as amostras foram ressuspensas em PBS e adicionado 1µL de C₁₁-BODIPY^{581/591} na concentração de 2mM, e incubadas a 37 °C por 30 min no escuro. Depois desse período, as amostras foram novamente lavadas em PBS para retirada de sonda não-ligada e analisadas por citometria de fluxo, utilizando o citômetro de fluxo BDFACSAria II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), no qual as sondas fluorescentes foram excitadas por um laser de argônio de 488nm. Para detecção de fluorescência verde utilizou-se o filtro FL-1(530/30nm) e para a vermelha o filtro FL-3(620nm). Os dados foram coletados utilizando BD FACSDivaTM Software (Becton Dickinson) e avaliadas 10.000 células, sendo classificadas em oxidadas (verde) e não oxidadas (vermelho).

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad InStat (versão 3.10, 2009). Os dados foram testados para normalidade e homogeneidade da variância usando o método de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett's test respectivamente. Para comparação das médias utilizou-se o Teste T. Todos os valores foram expressos em média e desvio padrão, nível de significância ($p < 0,05$). Para correlação entre as variáveis foi utilizado o teste de correlação de Pearson.

RESULTADOS

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, pode-se observar que concentração de malonaldeído em espermatozoides criopreservados de caprinos e ovinos, pelo método de TBARS, quando analisado por espectrofotometria (UV-Visível) apresentou resultados significativamente maiores ($P < 0,05$) do que os encontrados por HPLC-DAD.

Ao se utilizar a técnica de fluorescência (C11-BODIPY^{581/591}), evidenciou-se que $2,18 \pm 0,1\%$ e $2,59 \pm 0,01\%$ dos espermatozoides caprinos e ovinos, respectivamente, apresentaram peroxidação lipídica da membrana, após terem sido submetidos à congelamento/descongelamento.

Além disso, foi realizada análise de correlação entre os testes de mensuração do MDA, onde para os dados da espécie caprina não houve correlação $R = -0,25499$ ($R^2 = 0,065$). Entretanto, nas amostras da espécie ovina observou-se correlação moderada $R = 0,463293$ ($R^2 = 0,2146$) entre as técnicas.

Não foi realizado teste de correlação entre as técnicas do C11-BODIPY e as de mensuração do MDA, por esta correlação ser pouco representativa, já que as técnicas diferem em seus mecanismos (oxidação da sonda x produção de MDA) e unidades de medida (unidades de fluorescência x nmol/mL de MDA).

DISCUSSÃO

A falta de especificidade do método de dosagem do TBARS para detecção dos produtos da lipoperoxidação (STEGHENS et al., 2001) é alvo de muitas críticas, devido à formação de artefatos (LYKKESFELDT, 2007), tornando necessário o uso de técnicas de avaliação mais adequadas para uso em espermatozoides. Neste experimento foram utilizados diferentes métodos para avaliação da peroxidação lipídica de espermatozoides de caprinos e ovinos, observando-se que a peroxidação apresentada pelo método de TBARS, avaliado por espectrofotometria (UV-Visível), foram superiores àqueles obtidos por HPLC-DAD.

Corroborando com estes achados, Tug et al. (2005) também encontraram concentrações significativamente maiores de MDA por espectrofotometria, quando comparado ao HPLC, em soro de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. Entretanto, Durfinová et al. (2007) não observaram diferença entre os testes, sendo semelhantes os resultados obtidos por eles, quando avaliadas as concentrações de MDA em tecidos cerebrais de ratos.

Apesar do método espectrofotométrico apresentar a vantagem de ser simples, sensível e ter custo razoável, não é específico para a dosagem de MDA em amostras biológicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1981; KIKUGAWA et al., 1988), estando os seus resultados sujeitos a vários erros (BIRD et al., 1983), como observado neste estudo. Portanto, vem-se utilizando a cromatografia líquida de alta performance que além de sensível, é específica, reprodutível e estável (BIRD et al., 1983), porém de custo mais elevado. No entanto, se obtém resultados confiáveis.

Todavia, a determinação da concentração de MDA, um dos produtos da peroxidação lipídica, possível via que permite avaliar os danos celulares causados pelo estresse oxidativo (DURFINOVÁ et al., 2007), fornece uma medida indireta da peroxidação, sem resolução subcelular das alterações ocorridas nas membranas (PAP et al., 1999). Neste caso, a formação de ROS pode ter ocorrido em apenas uma pequena parcela da população (GUTHRIE e WELCH, 2012), fato observado nos resultados deste estudo, onde se constatou um baixo percentual de células marcadas pelo C11-BODIPY.

A sonda fluorescente C11-BODIPY é considerada um método confiável e fácil para avaliar a peroxidação lipídica, que necessita de uma quantidade reduzida de amostras (NAGUIB, 1998; BALL e VO, 2002; BROUWERS e GADELLA, 2003), diferente das demais técnicas que necessitam de grande quantidade de material. Quando avaliada por citometria de fluxo, apresenta a desvantagem do alto custo do aparelho, mas trata-se de um método rápido e prático, sendo uma ferramenta valiosa para pesquisa (AITKEN et al., 2007).

Além destes métodos, existem outros testes para avaliação da peroxidação lipídica, mas a maioria necessita do uso de aparelhos caros e especializados, e não apresentam o mesmo rendimento do ensaio do TBA por HPLC (LYKKESFELDT, 2001). Diferentes testes podem ser realizados para cada fase desse processo, como a detecção de dienos conjugados, detecção do 4-hidroxinonal, teste do alaranjado de xilenol, detecção dos isoprostanos, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por quimiluminescência, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LIMA e ABDALLA, 2001). No entanto, alguns deles não são aplicáveis para espermatozoides.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados, é possível concluir que, o método de dosagem de MDA mais indicado para avaliação da ocorrência de peroxidação lipídica em espermatozoides de caprinos e ovinos é o de HPLC-DAD. Todavia, recomenda-se também o uso, em associação, da técnica de fluorescência com C11-BODIPY.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão de uma bolsa de estudo de mestrado e apoio financeiro, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659- 68, 1995.

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

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

BERNHEIM, F.; BERNHEIM, M. L. C.; WILBUR, K. M. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 174, p. 257-264, 1948.

BIRD, R.P.; HUNG, S.O.S.; HADLEY, M.; et al. Determination of malondialdehyde in biological materials by high-pressure liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 128, p. 240–244, 1983.

BROUWERS, J.F.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1382–1391, 2003.

CANDAN, N.; TUZMEN, N. Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography – fluorescence detection. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 709-713, 2008.

ŘURFINOVÁ, M.; BRECHTLOVÁ, M.; LÍŠKA, B.; et al. Comparison of Spectrophotometric and HPLC Methods for Determination of Lipid Peroxidation Products in Rat Brain Tissues. **Chemical Papers**, v. 61, p. 321—325, 2007.

DRUMMEN, G.P.; VAN LIEBERGEN, L.C.M.; OP DEN KAMP, J.A.F. et al. C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 473–490, 2002.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R.J., ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, p. 81–128, 1991.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p. 1700-1708, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEBS Letters**, v. 15, p. 347-52, 1981.

KIKUGAWA, K.; KATO, T.; IWATA, A. Determination of malonaldehyde in oxidized lipids by the Hantzsch fluorometric method. **Analytical Biochemistry**, v. 1, p. 512-21, 1988.

LI, K.; SHANG, X.; CHEN, Y. High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male infertility. **Clinica Chimica Acta**, v. 346, p. 199–203, 2004.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 293-303, 2001.

LONG, J.A.; KRAMER, M. Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. **Poultry Science**, v. 82, p. 1802-1807, 2003.

LYKKESFELDT, J. Determination of malondialdehyde as dithiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. **Clinical Chemistry**, v. 47, p. 1725-1727, 2001.

LYKKESFELDT, J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. **Clinica Chimica Acta**, v. 380, p. 50–58, 2007.

NAGUIB, Y.M. A fluorometric method for measurement of peroxy radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 265, p. 290–298, 1998.

MELLO FILHO, A.C.; HOFFMAN, M.E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, p. 273-275, 1984.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial**. 5ª Ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. 344p.

PAP, E.H.W.; DRUMMEN, G. P. C.; WINTER, V. J. et. al. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY(581/591). **FEBS Letters**, v. 453, p. 278–282, 1999.

PARTYKA, A.; ŁUKASZEWICZ, E.; NIZANSKI, W.; et al. Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C11-BODIPY^{581/591}. **Theriogenology**, v. 75, p. 1623–1629, 2011.

PORTER, N.A.; NIXON, J.; ISAAC, R. Cyclic peroxides and the thiobarbituric assay. **Biochimica Biophys Acta**, v. 441, p. 506-512, 1976.

PRYOR, W.A.; STANLEY, J. P.; BLAIR, E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin like endoperoxides. **Lipids**, v. 11, p.370-379, 1976.

PRYOR, W. A. Methods of detecting free radicals and free radical-mediated pathology in environmental toxicology molecular basis of environmental toxicity. In *Molecular Basis of Environmental Toxicity* (Bhatnagar, R. S. ed.) p. 3-36. Ann Arbor Science, 1980.

SHINNHUBER, R. O.; YU, T. C.; YU TE, C. Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. **Food Research**. v.23, p.626-34, 1958.

STEGHENS, J.P.; KAPPEL, A.L.V.; DENIS, I.; et al. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 242-249, 2001.

TUG, T.; KARATAS, F.; TERZI, S.M.; et al. Comparison of Serum Malondialdehyde Levels Determined by Two Different Methods in Patients With COPD: HPLC or TBARS Methods. **Labmedicine**, v. 36, p. 41-44, 2005.

Tabela 1 - Valores médios da concentração de malonaldeído (nmol/mL) e porcentual de espermatozoides portadores de peroxidação lipídica, obtidos pelo uso do C₁₁-BODIPY^{581/591} em amostras criopreservadas de sêmen de caprinos e ovinos

Testes	Amostras de Sêmen	
	Caprino	Ovino
Espectrofotômetro (nmol/mL de MDA)	2,9±1,2 ^a	6,6±3,2 ^a
HPLC (nmol/mL de MDA)	0,2±0,1 ^b	2,9±0,7 ^b
C11-BODIPY (%)	2,1±0,1	2,5±0,0

Letras diferentes na mesma coluna P <0,05.

ESTUDO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE CAPRINOS E OVINOS COM TROLOX

L.C.P. ARRUDA¹, G.R. SILVA², A.M.BATISTA¹, E.C.B. SILVA¹, H.M. SOUZA¹,
T.M.S. SILVA², M.M.P. GUERRA¹.

- 1- Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n. Dois Irmãos, Recife, PE. CEP: 52171-900, Brasil.
- 2- Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica (BIOFITO), Departamento de Ciências Moleculares – UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n. Dois Irmãos, Recife, PE. CEP: 52171-900, Brasil.

RESUMO

Objetivando avaliar a ocorrência de peroxidação lipídica da membrana plasmática de espermatozoides caprinos e ovinos criopreservados com Trolox, amostras de sêmen foram diluídas em Leite desnatado (Glicerol 7%) (caprino) ou Tris-gema de ovo (Glicerol 5%) (ovino), sem antioxidante ou adicionadas de Trolox nas concentrações de 20 μ M ou 40 μ M/mL. Após descongelação a 37 °C/30s, as amostras foram submetidas à avaliação da peroxidação lipídica por cromatografia líquida de alta performance acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) e citometria de fluxo (C₁₁-BODIPY^{581/591}), assim como a integridade de membrana plasmática e acrossomal por microscopia fluorescente e cinética espermática pelo sistema computadorizado de análise dos espermatozoides (CASA). Não foi constatada diferença significativa (P>0,05) entre os grupos experimentais de ambas as espécies para os parâmetros de cinética espermática e de integridade de membranas plasmática e acrossomal, bem como não foi observada diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos para redução da ocorrência de peroxidação lipídica na membrana plasmática dos espermatozoides. Além disso, a análise de peroxidação lipídica dos diluidores demonstrou que o leite desnatado apresenta baixa concentração de malonaldeído, entretanto, o Tris-gema de ovo apresentou altos níveis de peroxidação, interferindo nos resultados de mensuração do MDA das amostras de sêmen ovino. Conclui-se que o processo de criopreservação não desencadeou a peroxidação lipídica da

membrana plasmática de espermatozoides caprinos e ovinos com ou sem adição de Trolox (20 e 40 μM).

Palavras-chave: lipoperoxidação, antioxidantes, sêmen, Trolox, HPLC-DAD, C₁₁-BODIPY^{581/591}

ABSTRACT

Aiming to assess the occurrence of lipid peroxidation on plasma membrane of goat and sheep sperm cryopreserved with Trolox, semen samples were diluted in skimmed milk (goat) or tris-egg yolk (sheep) extenders, without antioxidants or with Trolox at 20 μM or 40 μM /mL. After thawing at 37°C for 30 seconds, samples were submitted to assessment of lipid peroxidation by high performance liquid chromatography (HPLC-DAD) and flow cytometry (C₁₁-BODIPY^{581/591}), as well as plasma membrane and acrosomal integrity in fluorescent microscopy and sperm kinematic by computer-assisted sperm analysis (CASA). No significant difference ($P>0.05$) was observed among experimental groups of both species to sperm kinematics, plasma membrane and acrosomal integrity. Significant difference also was not observed ($P>0.05$) among treatment groups to lipid peroxidation reduction on sperm plasma membrane. Furthermore, the analysis of extenders lipid peroxidation demonstrated that the skimmed milk extender presented low concentration of malonaldehyde, whereas Tris-egg yolk extender showed high levels of peroxidation, interfering on MDA measurement results of ram semen samples. In conclusion, the process of cryopreservation did not trigger lipid peroxidation of plasma membrane of goat and sheep semen with or without addition of Trolox (20 and 40 μM).

Keywords: lipid peroxidation, antioxidants, semen, Trolox, HPLC-DAD, C₁₁-BODIPY^{581/591}

INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen determina alterações celulares que contribuem para a diminuição da fertilidade, quando comparado ao sêmen fresco, sendo uma das estruturas mais afetadas a membrana plasmática (BICUDO et al., 2007), cujos danos são ocasionados pela geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (AITKEN, 1995).

A reação das ROS com os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, iniciam um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (LIMA e ABDALLA, 2001).

Os lipoperoxidos e suas substâncias metabolizadas produzem, pelo processo de indução da LPO, lesão celular que acelera a apoptose das células germinativas, resultando no aumento da quantidade de espermatozoides associados com a infertilidade e a aparente redução da qualidade seminal, incluindo anormalidades da peça intermediária, diminuição da motilidade e perda da capacidade do espermatozoide realizar a reação de acrossoma e conseqüentemente fertilização (AITKEN et al., 1993).

Na tentativa de minimizar os danos causados às células espermáticas pela peroxidação lipídica, diversos antioxidantes vêm sendo testados (MAXWELL e STOJANOV, 1996), dentre eles a vitamina “E” e seu análogo hidrossolúvel, o Trolox, que é indicado como um excelente protetor contra a peroxidação lipídica (SCOTT et al., 1974), protegendo os espermatozoides dos danos oxidativos do DNA e da membrana (SIKKA, 1996).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi estudar a ocorrência de peroxidação lipídica da membrana plasmática de espermatozoides caprinos e ovinos criopreservados com Trolox, pelo ensaio do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC-DAD), e por imunofluorescência (C11-BODIPY^{581/591}), em citometria de fluxo.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes:

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma–Aldrich Company (St. Louis, MO, USA), com exceção do ácido 2-tiobarbitúrico (MERCK, Darmstsd, Germany), Hidróxido de potássio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Hidróxido de sódio (NUCLEAR, Diadema, SP, Brasil), Metanol (CARLOS ERBA, Val-de-Reuil, França).

Animais:

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos e seis reprodutores ovinos, os quais foram submetidos à avaliação clínica e andrológica para comprovação da higidez e possibilidade de

participar do delineamento experimental, de acordo com os padrões mínimos recomendados (MIES FILHO, 1982). Os animais foram alocados em baias, recebendo dieta à base de feno de capim tifton, ração peletizada, além de sal mineral e água *ad libitum*.

Colheita e análise do sêmen:

Os ejaculados foram colhidos pelo método de vagina artificial, usando uma fêmea como manequim. Imediatamente após a colheita, as amostras de sêmen foram submetidos à análise microscópica [movimento de massa (≥ 3), motilidade (0,0-100,0%), e vigor (≥ 3) espermático], em microscópio de contraste de fase (Olympus Optical Co., Ltda., Tokyo, Japan). Foram selecionados animais cujos ejaculados apresentaram valores mínimos de 70,0% de motilidade e 3 de vigor (MIES FILHO, 1982).

- Caprinos:

As colheitas de sêmen foram realizadas a cada 48h, sendo obtido um ejaculado de cada animal a cada colheita, sendo realizadas um total de cinco colheitas. Após análise e aprovação de cada um dos ejaculados dos cinco animais, de cada dia de colheita, procedeu-se a formação do *pool* dos ejaculados para posterior diluição. A determinação da concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer.

As amostras de sêmen caprino foram submetidas à lavagem [centrifugação a 1200rpm/10min, 2vezes, com Tris (3,605 g de Tris-hidroximetilaminometano, 2,024 g de ácido cítrico, 1,488 g de frutose e 100 mL de água miliQ; pH 6,8)] para retirada do plasma seminal. Em seguida, o *pellet* foi diluído com Leite desnatado (Glicerol 7%), com ou sem adição de Trolox, de acordo com os grupos experimentais (G1= controle; G2= 20 μ M de Trolox; G3= 40 μ M de Trolox)

- Ovinos:

As colheitas de sêmen foram realizadas a cada 48h, sendo obtido um ejaculado de cada animal a cada colheita, sendo realizadas um total de seis colheitas. Após análise e aprovação de cada um dos ejaculados dos seis animais, de cada dia de colheita, procedeu-se a formação do *pool* dos ejaculados para posterior diluição. A determinação da concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer.

Uma vez que as amostras de sêmen ovino não precisam ser lavadas para retirada do plasma seminal, procedeu-se imediatamente a diluição em Tris-gema de ovo (Glicerol 5%), com

ou sem adição de Trolox, de acordo com os grupos experimentais (G1= controle; G2= 20 µM de Trolox; G3= 40 µM de Trolox).

Congelação:

Após diluição, as amostras de sêmen correspondentes aos grupos experimentais foram envasadas em palhetas (0,25 mL; 50×10^6 espermatozoides) e processadas em máquina de congelação de sêmen (modelo TK 3000, TK tecnologia em Congelação Ltda, Brasil), utilizando a seguinte curva de congelação (-0,25 °C/min até atingir 5 °C, após estabilização por 2h, em seguida -15 °C/min até -120 °C). Imediatamente após a congelação as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenadas em botijão criobiológico. Para análise espermática descongelou-se quatro palhetas de sêmen de cada grupo experimental de cada uma das espécies em banho-maria (37 °C, 30 s) e alíquotas dessas amostras foram avaliadas quanto cinética espermática, integridade do acrossoma, integridade da membrana plasmática e peroxidação lipídica para ambas espécies.

Preparo das amostras:

- Peroxidação Lipídica:

Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

As amostras de sêmen fresco e criopreservado, e do diluidor foram preparadas segundo metodologia descrita por Candan e Tuzmen (2008), com modificações, onde em um tubo de vidro com tampa foi adicionada uma alíquota (200µL) de sêmen, 750µL de H₃PO₄ (440mM) e 50µL de TBA (42mM). Essa mistura foi aquecida por 1h a 100 °C, e após atingirem a temperatura ambiente, foi retirada uma alíquota (500µL), colocada em tubo de microcentrífuga, a qual foi adicionado 500µL do reagente de precipitação [MeOH:1 M NaOH (91:90)]. A seguir, as amostras foram centrifugadas (13000rpm por 5 min) e retirado o sobrenadante que foi filtrado em filtro de membrana (0,22 µm) e colocado em um “vail” para injeção no aparelho de HPLC-DAD.

Utilizou-se o HPLC (Shimadzu Prominence, modelo LC-20AT), equipado com detector de arranjo de diodo (SPDM 20), forno da coluna (CTO-20AC), autoinjeter (SIL-20A), duas

bombas (LC-6AT), degaseificador (DGu-20As) e módulo de comunicação (CBM-20A) controlado pelo software LC-Solution.

Para as separações cromatográficas utilizou-se a coluna Rexchorm S5-100-ODS (150mmx4,6mm I.D. 5µm 100Å) à uma temperatura de 30 °C e coluna de guarda Security Guard Catridge Holder C18 (4x3.0mm), utilizando como fase móvel uma solução tampão de metanol-fosfato de potássio (50mM, pH=6.8; 40:60, v/v), a qual foi previamente filtrada em filtro de membrana (0,45µm; Millipore, Bedford, MA) e injetada em condição isocrática, com uma taxa de fluxo de 0.6 mL/min.

Os cromatogramas foram registrados em um comprimento de onda fixado em 532nm. O tempo de corrida foi 8 min, e o volume de injeção da amostra de 10µL. Todas as amostras foram preparadas e analisadas em triplicata. As concentrações de malonaldeído foram expressas em nmol/mL.

C₁₁-BODIPY^{581/591}

Para análise da peroxidação lipídica através da sonda fluorescente C₁₁-BODIPY^{581/591} [4,4- difluoro -5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)- 4- bora-3 a,4 a- diaza- s- indacene- 3- undecanoic acid; InvitrogenTM, Eugene, Oregon, USA], descongelou-se 1 palheta de sêmen a 37 °C por 30 s, os quais foram centrifugados duas vezes em PBS (Fosfato Salino Tamponado), a 1500rpm por 5 min. A seguir, as amostras foram ressuspensas em PBS e adicionado 1µL de C₁₁-BODIPY^{581/591} na concentração de 2mM, e incubadas a 37 °C por 30 min no escuro. Depois desse período, as amostras foram novamente lavadas em PBS para retirada de sonda não-ligada e analisadas por citometria de fluxo, utilizando o citômetro de fluxo BDFACSAria II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), no qual as sondas fluorescentes foram excitadas por um laser de argônio de 488nm. Para detecção de fluorescência verde utilizou-se o filtro FL-1(530/30nm) e para a vermelha o filtro FL-3(620nm). Os dados foram coletados utilizando BD FACSDivaTM Software (Becton Dickinson) e avaliadas 10.000 células, sendo classificadas em oxidadas (verde) e não oxidadas (vermelho).

Integridade de acrossoma

A integridade do acrossoma foi avaliada retirando-se uma alíquota (10µL) da amostra de sêmen de cada grupo experimental para a confecção das lâminas, as quais foram armazenadas a 4 °C, protegidas da luz e analisadas no prazo de duas semanas. As lâminas foram coradas no

momento da análise através da técnica de coloração *FITC*-conjugada ao *Peanut aglutinina* (*FITC-PNA*, SILVA et al., 2011), onde 30 μ L de solução de trabalho de *PNA* (1mg/mL) foi depositado no centro da lâmina e efetuada a homogeneização da amostra.

Posteriormente, as lâminas sofreram refrigeração a 4 °C durante 20 min e, após este período, foram lavadas em 50mL de PBS e colocadas no isopor para secagem em temperatura ambiente. Após secagem, alíquotas de 5 μ L da solução UCD (5mg Ázida sódica, 0,5mL PBS, 0,1% w/v Fenilenediamina, 4,5 mL Glicerol; pH 8,0) foram colocadas entre a lâmina e lamínula, e observadas em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) utilizando o filtro de fluoresceína (450-490nm, espelho dicromático de 510nm), quando foram contados 200 espermatozoides/lâmina e classificados em acrossomas intactos (AI), quando apresentaram-se corados em verde e de acrossomas reagidos (AR), quando apresentaram coloração verde mesclada, sem coloração ou apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática.

Integridade da membrana plasmática

A análise de integridade da membrana plasmática (iMP) foi realizada com diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e iodeto de propídio (IP), segundo a metodologia descrita por Silva et. al. 2011. Alíquotas (10 μ L) de sêmen foram diluídas em 30 μ L de Tris contendo 5 μ L de DCF (0.46 mg/ml em DMSO) e 20 μ L de PI (0,5 mg/mL em PBS). Um total de 200 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany; 400 x), usando filtro de emissão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485/20 nm, e classificados como portadores de membrana intacta, quando apresentaram-se corados em verde, ou de membrana danificada, quando corados em vermelho.

Cinética espermática

Uma amostra (10 μ L) do sêmen foi colocada em um tubo de microcentrífuga, no qual foi adicionado 30 μ L de Tris com o objetivo de reduzir a concentração de espermatozoides e a densidade dos diluidores utilizados, visando evitar a sobreposição de células e facilitar a captura das imagens. A análise foi realizada da seguinte maneira: uma alíquota (5 μ L) da amostra foi colocada em uma lâmina e coberta por lamínula, as quais estavam sobre uma placa previamente aquecida (37°C) e avaliadas em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i; Nikon, Tokyo, Japan). As imagens foram capturadas com uma câmera digital Basler A312FC (Basler Vision

Technologies, Ahrensburg, Germany) com ampliação de 400x. Foram escolhidos, aleatoriamente, pelo menos, cinco campos por amostra, onde os resultados foram digitalizados, registrando-se, no mínimo, 2000 espermatozoides móveis. Na sequência, foram avaliados os parâmetros de motilidade total (Mt), motilidade progressiva (Mp), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e índice de oscilação (WOB), expressos em porcentual, e velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média da trajetória (VAP), expressos em micrômetros por segundo, utilizando o software SCA™ v 5.1 (Microptics, SL, Barcelona, Espanha).

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad InStat (versão 3.10, 2009). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), para cada conjunto de grupos experimentais, verificando-se efeitos dos tratamentos e suas respectivas interações, com nível de significância de 5%. Quando na presença de significância, teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer para comparações de médias foram realizados. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

RESULTADOS

As amostras de sêmen congelado/descongelado de reprodutores caprinos e ovinos não evidenciou diferença significativa ($P>0,05$) para nenhum dos parâmetros cinéticos avaliados (Mt, Mp, VCL, VSL, VAP, LIN, STR e WBO) entre os grupos (Tabela 1 e 2). Assim como não houve diferença significativa ($P>0,05$) no porcentual de espermatozoides com membranas plasmáticas e acrossomal íntegras.

A concentração de MDA não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos das amostras de sêmen caprino criopreservados com ou sem adição de Trolox como entre as de sêmen fresco e do diluidor (Tabela 3). Todavia, a concentração de malonaldeído nas amostras de sêmen ovino evidenciou diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos experimentais, tendo observado maiores valores nas amostras criopreservadas sem antioxidante (controle) e suplementados com Trolox (20 e 40 μM), quando comparados às amostras de sêmen fresco (Tabela 4). No entanto, os percentuais de espermatozoides ovinos identificados com peroxidação lipídica, pela sonda fluorescente (C11-BODIPY^{581/591}), não diferiram ($P>0,05$) entre as amostras de sêmen criopreservadas com ou sem adição de Trolox (20 e 40 μM).

DISCUSSÃO

Apesar dos lipídios serem considerados os principais alvos das ROS (SIKKA, 1996), as quais tem a produção intensificada durante o processo de criopreservação do sêmen (WATSON, 2000), e considerada uma importante causa de disfunção espermática (AITKEN, 1995), o presente estudo demonstrou, pelos métodos de dosagem de malonaldeído (HPLC) e fluorescência (C₁₁-BODIPY^{581/591}), que nas condições deste experimento, o processo de congelamento/descongelamento do sêmen de caprinos e ovinos não causou danos peroxidativos aos espermatozoides.

Embora tenha sido observada diferença significativa entre as amostras de sêmen fresco e criopreservado da espécie ovina, ao se utilizar o método de cromatografia, este resultado deveu-se ao tipo de diluidor utilizado e não à peroxidação na célula espermática. Esta afirmação é comprovada pelo fato do diluidor tris-gema de ovo, utilizado sem a adição de espermatozoides, ter apresentado maiores níveis de peroxidação do que as amostras contendo sêmen, corroborando com os relatos de Sicherle et al. (2011). Fato que pode ser justificado pelos efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio, que podem ser potencializados em diluidores à base de gema de ovo, devido à presença de ferro e outros metais de transição neste substrato (ABOAGLA e TERADA, 2004). Além disso, a presença de vários agentes antioxidantes encontrados no sêmen (AITKEN, 1995) podem também ter contribuído para a redução da peroxidação no meio após a diluição.

Com isso, sendo a peroxidação lipídica também reconhecida como um processo prejudicial para os espermatozoides, em virtude da perda da motilidade espermática em muitas espécies de animais (AITKEN et al. 1989; LENZI, 1996) e já ter sido observada uma correlação negativa entre o estresse oxidativo e a motilidade em espermatozoides de carneiros (PERIS et al.; 2007), a hipótese de que neste experimento a criopreservação do sêmen não causou peroxidação lipídica nos espermatozoides de caprinos e ovinos fica mais evidente, já que estes gametas apresentaram motilidade total superior a 70% (caprinos) e 60% (ovinos) pós-criopreservação, e não apresentaram alterações expressivas nos demais parâmetros cinéticos e de integridade de membranas. Além disso, este resultado fica confirmado pela observação de baixo percentual de células marcadas pelo fluoróforo C₁₁-BODIPY, tanto para espécie caprina quanto para a ovina, complementam os dados obtidos ao se realizar a mensuração de MDA por HPLC.

Ressalta-se que os efeitos da vitamina “E” na proteção das células espermáticas contra a lipoperoxidação apresenta resultados contraditórios na literatura. Neste trabalho, o uso do Trolox nas concentrações de 20 e 40 µM não reduziu as concentrações de malonaldeído presentes nas

amostras, quando comparado ao controle. Da mesma forma, Sicherle et al. (2011) também não detectaram diminuição dos níveis de peroxidação quando adicionado o Trolox (100 μ M/10⁸ espermatozoides) ao meio de congelação de sêmen ovino. Todavia, o Trolox foi eficiente em reduzir a peroxidação lipídica induzida por 0.24 nmol FeSO₄. Por outro lado, Maia et al. (2010), utilizando Trolox (50 μ M Trolox/10⁸ espermatozoides) em meio para congelação de sêmen ovino, observaram redução da peroxidação lipídica, assim como Cerolini et al. (2000) constataram que o α -tocoferol também foi capaz de reduzir significativamente a ocorrência da LPO, em espermatozoide refrigerados de suínos.

No entanto, o tratamento antioxidante com Trolox também não demonstrou efeitos significativos na cinética espermática de ambas as espécies estudadas, ratificando os relatos de Sicherle et al. (2011), que não obtiveram nenhum efeito sobre os parâmetros cinéticos de espermatozoides criopreservados de reprodutores ovinos, quando adicionados 100 μ M de Trolox ao diluente. Da mesma forma, Cabrita et al. (2011) também não observaram melhora na qualidade dos parâmetros cinéticos de espermatozoides de peixes, submetidos à refrigeração (4°C, 1h) em meio contendo α -tocoferol. Em contrapartida, Silva et al. (2013), constataram que a adição de 60 e 120 μ M de Trolox ao meio Tris-gema de ovo, melhorou os parâmetros de Mp, VSL, VAP, LIN, WOB e STR. Desta forma, é possível correlacionar que alguns fatores, como método de congelação, uso de curva adequada de refrigeração, entre outros fatores, podem interferir na produção de ROS e, conseqüentemente, na ocorrência de peroxidação lipídica da membrana de espermatozoides caprinos e ovinos.

Ainda neste estudo, foi possível observar que o tratamento antioxidante não demonstrou ter melhorado os percentuais de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomas íntegros. Diferentemente, Azawi e Hussein (2013), afirmam que a vitamina “E” é capaz de preservar a integridade de membrana plasmática de espermatozoides de ovinos por até 120h a 5 °C, o mesmo não ocorrendo para a integridade de acrossoma. Silva et al. (2013) também observaram que o Trolox foi capaz de preservar a integridade de membrana plasmática de espermatozoides de ovinos, não havendo diferença para integridade de acrossoma.

Esta diferença observada entre as espécies pode estar relacionada à composição da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides caprinos e ovinos uma vez que a membrana espermática é rica em ácidos graxos poliinsaturados (AITKEN, 1995) que os torna mais sensíveis aos danos peroxidativos (POULOS et al., 1973) e danos a estrutura e integridade da membrana plasmática estão associados com a redução da fertilidade dos espermatozoides pós-descongelação (THOMAS et al., 2006).

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que o processo de criopreservação do sêmen, nestas condições, não provocou peroxidação lipídica nas células espermáticas e, conseqüentemente, não determinou alterações em seus parâmetros cinéticos e de integridade de membranas. No entanto, a composição do diluente utilizado para congelamento do sêmen interfere nos resultados de peroxidação, havendo necessidade de mais estudos a cerca de diluentes que minimizem esse efeito.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão uma bolsa de estudo de mestrado, e apoio financeiro e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOAGLA, E.M.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1160–1172, 2004.
- AITKEN, J.R.; CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology Reproduction**, v. 40, p. 183–197, 1989.
- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D.W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction Development**, v. 35, p. 302–15, 1993.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659- 68, 1995.
- AZAWI, O.I.; HUSSEIN, E.K. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 °C. **Veterinary Research Forum**, v. 4, p. 157-160, 2013.
- BICUDO S.D.; AZEVEDO H.C.; MAIA S.M.; et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com

embriões. Improvement on ram semen cryopreservation applied to artificial insemination programs and embryo technology. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35,(Supl. 3), p.787-798, 2007.

CABRITA, E.; M.A, S.; DIOGO, P.; et al. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Science**, v. 125, p. 189– 195, 2011.

CANDAN, N.; TUZMEN, N. Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminium and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography – fluorescence detection. **Neurotoxicology**, v. 29, p. 709-713, 2008.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; et al. Viability susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 99–111, 2000.

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

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; SICHERLE, C.C.; et al. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 122 , p. 118–123, 2010.

MAXWELL, W.M.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction Fertility and Development**, v. 8, p. 1013-1020, 1996.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial**. 5ª Ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. 344p.

PERIS, S.I.; BILODEAU, J.F.; DUFOUR, M. Impact of Cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 878–892, 2007.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 46, p. 541-549, 1973.

- SCOTT, J.W.; CORT, W.M.; HARLEY, H.; et al. 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 51, p. 200-203, 1974.
- SICHERLE, C.C.; MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; et al. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. **Small Ruminant Research**, v. 95, p. 144–149, 2011.
- SIKKA, S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 78-86, 1996.
- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 874-881, 2011.
- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; et al. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Animal Reproduction Science** v. 137, p. 37– 44, 2013.
- THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**. v. 65, p. 1531-1550, 2006.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

Tabela 1- Valores médios dos parâmetros cinéticos e percentuais de espermatozoides caprinos após criopreservação em leite desnatado, adicionado ou não de Trolox, com membrana plasmática e acrossoma intactos

Parâmetros Espermáticos	Grupos Experimentais		
	Controle	Trolox 20 μ M	Trolox 40 μ M
Mt(%)	70,0 \pm 12,9	70,4 \pm 5,6	62,7 \pm 10,7
Mp(%)	26,0 \pm 2,8	29,4 \pm 5,9	29,0 \pm 7,2
VCL(μ m/s)	87,0 \pm 8,4	80,4 \pm 5,6	88,1 \pm 13,1
VSL(μ m/s)	46,5 \pm 7,2	45,0 \pm 4,9	51,6 \pm 8,4
VAP(μ m/s)	61,2 \pm 7,8	56,6 \pm 3,4	63,9 \pm 10,8
LIN(%)	53,6 \pm 8,7	56,2 \pm 7,1	58,6 \pm 5,5
STR(%)	75,8 \pm 7,4	79,4 \pm 6,0	80,8 \pm 3,9
WBO(%)	70,3 \pm 5,4	70,5 \pm 3,7	72,4 \pm 4,0
iMP (%)	51,3 \pm 8,4	58,3 \pm 9,0	51,6 \pm 10,5
iAc (%)	86,7 \pm 3,7	92,1 \pm 3,6	90,6 \pm 1,4

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença significativa entre os grupos (P<0,05).

Mt: motilidade total, Mp: motilidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade em linha reta, VAP: velocidade média da trajetória, LIN: linearidade, STR: retidão, WBO: índice de oscilação, iMP: integridade de membrana plasmática, iAc: integridade de acrossoma.

Tabela 2- Valores médios dos parâmetros cinéticos e percentuais de espermatozoides ovinos após criopreservação em tris-gema de ovo, adicionado ou não de Trolox, com membrana plasmática e acrossoma intactos

Parâmetros Espermáticos	Grupos Experimentais		
	Controle	Trolox 20 μ M	Trolox 40 μ M
Mt(%)	62,7 \pm 7,2	66,0 \pm 10,6	69,7 \pm 7,8
Mp(%)	32,8 \pm 4,6	36,4 \pm 9,2	33,1 \pm 6,2
VCL(μ m/s)	88,0 \pm 18,4	85,3 \pm 12,6	87,0 \pm 9,9
VSL(μ m/s)	63,4 \pm 14,2	62,1 \pm 11,0	58,7 \pm 9,2
VAP(μ m/s)	76,8 \pm 17,5	74,7 \pm 12,5	74,4 \pm 10,3
LIN(%)	71,9 \pm 3,9	72,6 \pm 3,8	67,3 \pm 4,7
STR(%)	82,6 \pm 3,2	83,0 \pm 2,3	78,7 \pm 3,3
WBO(%)	86,9 \pm 2,2	87,4 \pm 2,4	85,3 \pm 2,9
iMP(%)	50,3 \pm 14,0	58,2 \pm 6,9	56,0 \pm 7,6
iAC(%)	61,5 \pm 7,0	64,5 \pm 6,5	64,9 \pm 8,8

Mt: motilidade total, Mp: motilidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade em linha reta, VAP: velocidade média da trajetória, LIN: linearidade, STR: retidão, WBO: índice de oscilação, iMP: integridade de membrana plasmática, iAc: integridade de acrossoma.

TABELA 3- Valores médios da concentração de malonaldeído (nmol/mL) em amostras de diluidor, de sêmen fresco e criopreservado e do porcentual de células espermáticas marcadas com peroxidação pela sonda fluorescente C₁₁-BODIPY^{581/591}, obtidos de reprodutores caprinos adicionadas ou não de Trolox

Testes	Grupos Experimentais				
	Controle	Trolox 20µM	Trolox 40µM	Sêmen Fresco	Diluidor
MDA (nmol/mL)	0,2±0,1	0,2±0,0	0,2±0,1	0,1±0,0	0,09±0,0
Células com LPO (%)	2,1±0,1	2,1±0,0	2,2±0,0		

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença significativa entre os grupos (P<0,05).

TABELA 4- Valores médios da concentração de malonaldeído (nmol/mL) em amostras de diluidor, de sêmen fresco e criopreservado e do porcentual de células espermáticas marcadas com peroxidação pela sonda fluorescente C₁₁-BODIPY^{581/591}, obtidos de reprodutores ovinos adicionadas ou não de Trolox

Testes	Grupos Experimentais				
	Controle	Trolox 20µM	Trolox 40µM	Sêmen Fresco	Diluidor
MDA (nmol/mL)	2,9±0,7 ^a	2,9±0,8 ^a	2,8±0,6 ^a	0,5±0,2 ^b	6,4±1,1 ^c
Células com LPO (%)	2,5±0,0	2,4±0,0	2,6±0,3		

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença significativa entre os grupos (P<0,05).

CONCLUSÃO

Conclui-se que o método de dosagem de MDA utilizado mais indicado para avaliação da ocorrência de peroxidação lipídica em espermatozoides de caprinos e ovinos é o de HPLC. Todavia, recomenda-se o uso associado com técnicas de fluorescência (C11-BODIPY). Além disso, o processo de criopreservação do sêmen, não provoca peroxidação lipídica nas células espermáticas e conseqüentemente, não determina alterações em seus parâmetros cinéticos e de integridade de membranas. Estes resultados justificam o fato da adição do Trolox aos diluidores não determinar efeito protetor sobre as membranas espermáticas.