

Alessandra Cunha Brandão

**Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmática e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozóides criopreservados de eqüinos**

São Paulo

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Alessandra Cunha Brandão

**Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmática e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides criopreservados de eqüinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

**Departamento**  
Reprodução Animal

**Área de concentração**  
Reprodução Animal

**Orientador**  
Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz  
D'Avila Assumpção

**Co-orientador**  
Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

São Paulo

2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2036 FMVZ	<p>Brandão, Alessandra Cunha</p> <p>Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmática e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides criopreservados de equinos / Alessandra Cunha Brandão. – São Paulo : A. C. Brandão, 2008.</p> <p>87 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2008.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal.</p> <p>Orientador: Profª. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção.</p> <p>1. Garanhão. 2. Criopreservação do sêmen. 3. Laser de baixa intensidade. 4. Viabilidade espermática. 5. Citometria de fluxo. I. Título.</p>
----------------	--



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

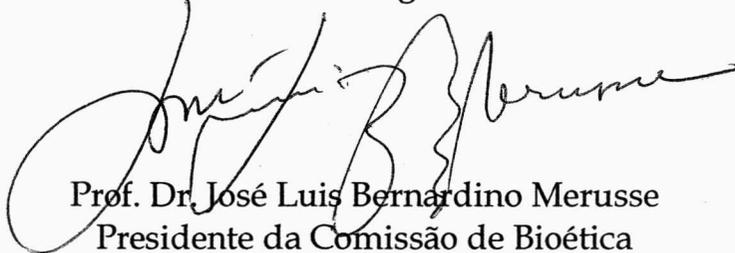
*Comissão Bioética*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do laser diodo sobre as características de motilidade, integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides eqüinos criopreservados", protocolado sob o nº1141/2007, utilizando 04 (quatro) cavalos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

We certify that the Research "Effect of diode laser in the motility, plasma membrane integrity, acrossome and mitochondrial of cryopreserved stallion spermatozoa", protocol number 1141/2007, utilizing 04 (four) horses, under the responsibility Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/07.

São Paulo, 22 de agosto de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRANDÃO, Alessandra Cunha

Título: **Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial mitocondrial de espermatozóides criopreservados de eqüinos**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Julgamento:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Julgamento:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Julgamento:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Julgamento:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Julgamento:** \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_ **Instituição:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_ **Julgamento:** \_\_\_\_\_

*Dedico aos cavalos, por sua  
maestria, perfeição,  
magnífica beleza e acima de  
tudo, por sua existência!*

*“A mais nobre paixão  
humana é aquela que ama a  
imagem da beleza, em vez da  
realidade material. O maior  
prazer está na  
contemplação.”*

*Leonardo da Vinci*

## AGRADECIMENTOS

Ao **Senhor do Universo** que sempre conspira com nossos ideais, realizando-os.

Aos meus **Tios Silvia e Amilton** por estarem sempre ao meu lado me apoiando em qualquer circunstância, com muito amor, afeto e confiança. Tens meu amor eterno e imensa gratidão.

Aos meus pais, **Joanilde e França**, que mesmo à distância tiveram sua participação em algum momento no desenvolvimento desse trabalho.

A minha avó **Joana** e meu tio **Marcos** por cuidarem dos meus filhos com muito amor e carinho no período em que estive em Pirassununga.

Ao meu co-orientador e amigo **Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda** pela constante ajuda, compreensão, amizade, oportunidades de aprendizado, colaborando sempre para o engrandecimento pessoal de todos aqueles que estão à sua volta. Sua acurácia para o desenvolvimento da pesquisa, dedicação e responsabilidades, são exemplos de um modo de vida que todos deveriam seguir.

A minha orientadora **Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D`Ávila Assumpção** pela paciência, compreensão, confiança em alguns momentos delicados durante o período de orientação. Ficam marcados minha sincera gratidão e respeito.

Ao **Prof. Dr. José Antonio Visintin** por estar sempre presente na vida dos pós-graduandos do departamento de Reprodução Animal, sempre interessado nos problemas de todos e procurando sempre ajudá-los. Tens meu respeito e sincera admiração.

Aos amigos pós-graduandos **André Furugen César de Andrade** (Japonês), **Fabian Bao** (Paraguai) e **Fabiane Zaffalon** (Fabibi) pela ajuda direta e constante em todo o período experimental e por ter tornado minha passagem por Pirassununga extremamente agradável e divertida.

As amigas pós-graduandas **Claudia Fernandes Raphael** (Claudinha) e **Juliana Nascimento** (Ju) pela colaboração tanto no trabalho como nos momentos felizes que passamos juntas.

Aos funcionários **Márcio, João, José e Maicol** pela colaboração durante as colheitas de sêmen e manejo dos animais.

A supervisora técnica da biblioteca **Elza Faquim** pela atenção e desempenho prestado.

Aos amigos do VRA que de alguma forma colaboram com meu trabalho e pela amizade.

À **Biotech-Botucatu** pela concessão de seus produtos, e **CNPQ** pelo apoio financeiro.

## RESUMO

BRANDÃO, A.C. **Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmática e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides criopreservados de eqüinos.** [Effect of diode laser on motility, plasma and acrosomal membrane integrity, and mitochondrial membrane potential of cryopreserved stallion spermatozoa]. 2008. 87 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A motilidade espermática depende do consumo de energia. Em algumas espécies, a mitocôndria espermática tem um importante papel na produção de energia para o batimento flagelar. A irradiação com Laser de baixa intensidade aumenta a produção de energia funcionando como uma ferramenta de biomodulação. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da irradiação contínua de 650 nm de comprimento de onda de Laser Diodo, com dose de  $6 \text{ J/cm}^2$  por 120s, na motilidade, integridade das membranas plasmática e acrossomal e no potencial de membrana mitocondrial em espermatozoides *in natura* e criopreservados. Cinco ejaculados foram obtidos de cinco garanhões (n=25). O sêmen foi acondicionado em palhetas de 0,5mL com  $200 \times 10^6$  cells/mL em diluidor Botu-Crio™ (Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Botucatu, Brasil) e congelado utilizando o sistema automático programável (TK3000®, TK Tecnologia em Congelamento\_Ltda, Uberaba, Brasil). As amostras *in natura* foram divididas em dois grupos: espermatozoides tratados COM LASER e espermatozoides não tratados - SEM LASER. As amostras congeladas foram divididas em três grupos: espermatozoides tratados COM LASER antes da congelação; espermatozoides tratados COM LASER depois da congelação e espermatozoides criopreservados não tratados – SEM LASER. As amostras criopreservadas foram analisadas imediatamente após a descongelação (tempo zero) e duas horas após a descongelação (tempo 2). A motilidade foi avaliada pelo sistema de análise espermática computadorizada (CASA,IVOS-Ultimate of Hamilton Thorne Biosciences), a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial foram avaliados pela técnica de citometria de fluxo (FACSaria-Beckton-Dickeson, San Jose, USA). Os dados foram analisados pelo programa SAS, com nível de significância de 5%. A frequência de batimentos flagelar (BCF) foi alta ( $P < 0,05$ ) para o grupo de espermatozoides *in natura* tratados COM LASER ( $34,8 \pm 0,7\%$ ) quando comparado com o grupo de espermatozoides *in natura* não tratados – SEM LASER ( $33,4 \pm 0,8\%$ ). No tempo zero, o potencial de membrana mitocondrial foi baixo no grupo de espermatozoides tratados COM

LASER antes da congelação ( $40,7 \pm 1,5\%$ ) quando comparados com o grupo de espermatozóides congelados não tratados - SEM LASER ( $47,4 \pm 2,4\%$ ) ( $P < 0,05$ ). Duas horas após a descongelação, as membranas plasmática e acrossomal apresentavam maior percentagem de integridade no grupo de espermatozóides tratados COM LASER antes da congelação ( $8,3 \pm 0,7\%$ ) do que no grupo congelado não tratados - SEM LASER ( $6,2 \pm 0,6\%$ ) ( $P < 0,05$ ). O grupo de espermatozóides tratados COM LASER depois da congelação não diferiu ( $P > 0,05$ ) dos outros grupos do tempo 2, porém no tempo zero a percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva foi baixa ( $2,0 \pm 0,3\%$ ) e diferente ( $P < 0,05$ ) dos outros grupos ( $6,5 \pm 1,3$  nos espermatozóides tratados COM LASER antes da congelação e  $5,5 \pm 1,1\%$  nos espermatozóides congelados não tratados - SEM LASER). Estes resultados indicam que a irradiação de 650 nm de comprimento de onda aumenta a frequência de batimentos flagelar no sêmen fresco e confere melhor proteção à membrana plasmática e acrossomal ao longo do tempo (após 2h de incubação). Os resultados com sêmen congelado permitem concluir que o melhor momento para a aplicação do laser é antes da criopreservação. Novos estudos com diferentes comprimentos de onda, potência do raio e dosagem devem ser conduzidos para se obter um melhor protocolo visando aprimorar a criopreservação do sêmen eqüino.

Palavras-chave: Garanhão. Criopreservação do sêmen. Laser de baixa intensidade. Viabilidade espermática. Citometria de fluxo.

## ABSTRACT

BRANDÃO, A.C. **Effect of diode laser on motility, plasma and acrosomal membrane integrity, and mitochondrial membrane potential of cryopreserved stallion spermatozoa.** [Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmática e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides criopreservados de eqüinos]. 2008. 87 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Sperm motility depends on energy consumption. In some species sperm mitochondria play an important role in the production of energy for tail activity. Low-level laser irradiation increases this production as a modulation tool. The objective of this study was to analyze the effect of a continuous 650 nm wavelength diode laser irradiation, with dose 6 J/cm<sup>2</sup> for 120s, in the motility, plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential in fresh and frozen equine spermatozoa. Five ejaculates were obtained from five stallions (n=25). Semen was packaged into 0.5mL straws with 200x10<sup>6</sup> cells/mL in a Botu-Crio<sup>TM</sup> (Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Botucatu, Brazil) and frozen by automated technique using a programmed machine (TK3000<sup>®</sup>, TK Tecnologia em Congelação-Ltda, Uberaba, Brazil). Fresh samples were divided in two groups: spermatozoa treated with laser and without laser (non treated spermatozoa), and frozen samples in three groups: spermatozoa treated with laser before freezing; spermatozoa treated with laser after thawing and without laser (cryopreserved spermatozoa). Cryopreserved samples were analyzed immediately after thawing (time 0) and two hours after thawing (time 2). Motility was evaluated by computer assisted sperm analysis (CASA, Ivos-Ultimate of Hamilton Thorne Biosciences), plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential were evaluated by flow cytometry (FACSaria-Beckton-Dickeson, San Jose, USA). The data were analyzed by the SAS program, at a 5% level. Beat cross frequency (BCF) test was higher (p<0.05) for fresh semen group treated with laser (34.8 ± 0.7%) as compared to non treated group (without Laser - 33.4 ± 0.8%). At time zero, mitochondrial membrane potential was lower in laser treatment before freezing group (40.7 ± 1.5%); compared to without laser treatment group (cryopreserved spermatozoa - 47.4 ± 2.4%) (P<0.05). Two hours after thawing, plasma and acrosomal integrity was higher (P<0.05) in the group were spermatozoa were treated with laser before freezing (8.3 ± 0.7%) compared with the group without laser treatment

(cryopreserved spermatozoa) ( $6.2 \pm 0.6\%$ ). The group treated with laser after thawing didn't show any difference ( $P > 0.05$ ) compared to the others groups at this period. However, at time 0 percentage of progressive motility was lower ( $2.0 \pm 0.3\%$ ) ( $P < 0.05$ ) than groups treated with laser before freezing ( $6.5 \pm 1.3\%$ ) and cryopreserved without laser ( $5.5 \pm 1.1\%$ ). These results indicated that the irradiation of 650 nm wavelength diode laser improves beat cross frequency in the fresh semen and support a long term (2 hours) protection to plasma and acrosomal membrane of equine spermatozoa. Based on the results of frozen semen, the best moment for laser application is before cryopreservation protocol. New studies with different diode laser wavelength, different power and energy doses should be driven in order to improve stallion semen cryopreservation.

Key words: Stallion. Semen cryopreservation. Low level laser. Sperm viability. Flow cytometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do delineamento experimental.....	50
Figura 2 – Fluxograma do delineamento experimental.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Médias ( $\pm$ EP) dos tipos de movimento espermático avaliados pelo CASA, nas amostras <i>in natura</i> diluídas, nos tratamentos LASER e SEM LASER (Pirassununga-2007).....	61
Tabela 2 -	Médias ( $\pm$ erros padrão) dos espermatozóides avaliados pela citometria de fluxo das características das membranas plasmática e acrossomal (PIAI) e alto potencial de membrana mitocondrial (APM), nas amostras <i>in natura</i> diluídas, nos grupos LASER e SEM LASER (Pirassununga-2007).....	63
Tabela 3 -	Médias ( $\pm$ erros padrão) das avaliações espermáticas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), nas amostras descongeladas no T0, com os tratamentos LASER ANTES (da congelação), LASER DEPOIS (da descongelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007).....	64
Tabela 4 -	Médias ( $\pm$ erros padrão), obtidas pela análise por citometria de fluxo das características das membranas plasmática e acrossomal (PIAI) e do alto potencial de membrana mitocondrial (APM), nas amostras descongeladas no T0, com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007).....	65
Tabela 5 -	Médias ( $\pm$ erros padrão), obtidas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), nas amostras descongeladas no T2 (após 2 horas), com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007).....	66
Tabela 6 -	Médias ( $\pm$ erros padrão), obtidas pela análise por citometria de fluxo das características das membranas plasmática e acrossomal (PIAI) e do alto potencial de membrana mitocondrial (APM), nas amostras descongeladas no T2, com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007). .....	70

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Histograma “dot plots” dos resultados da análise, pela citometria de fluxo, das membranas plasmática e acrossomal (subpopulações), em amostra de sêmen <i>in natura</i> , no grupo SEM LASER (Pirassununga-2007).....	54
Gráfico 2-	Histograma “dot plots” dos resultados da análise do potencial de membrana mitocondrial (subpopulações) pela citometria de fluxo, em amostra de sêmen <i>in natura</i> , no grupo SEM LASER (Pirassununga-2007).....	55
Gráfico 3 -	Médias da variável VAP ao longo do tempo, mostrando interação tempo x tratamento obtidas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), nas amostras descongeladas (T0 e T2), com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007).....	67
Gráfico 4 -	Médias da variável VSL ao longo do tempo, mostrando interação tempo x tratamento obtidas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), nas amostras descongeladas (T0 e T2), com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007).....	68
Gráfico 5 -	Médias da variável VCL ao longo do tempo, mostrando interação tempo x tratamento obtidas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), nas amostras descongeladas (T0 e T2), com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007).....	69
Gráfico 6 -	Médias da variável ALH ao longo do tempo, mostrando interação tempo x tratamento obtidas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), nas amostras descongeladas (T0 e T2), com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007).....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrometro
ALH	Deslocamento lateral da cabeça
ANOVA	Análise de variância
APHA	Associação americana de Paint Horse
AQHA	Associação americana de cavalo quarto de milha
ATP	Adenosina trifosfato
BCF	Frequência de batimentos flagelar
BSA	Albumina séricabovina
$\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de calcio dihidratado
CASA	Análise computadorizada do movimento espermático
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
CLC	Ciclodextrina
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
ConA	<i>Concanavalia ensiformes</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EthD-1	Brometo de Etídio
FITC	Isoticionato de fluoresceína
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
GaAIAs	Gallium aluminium arsenide
GaAs	Gallium arsenide
GIFT	Transferência de gametas intrafalopiana
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HeNe	Hélio-neon
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóide
J	Joule

J/cm <sup>2</sup>	Joule por centímetro quadrado
JC-1	5,5', 6,6' tetrachloro – 1,1', 3,3' – tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide
KCl	Cloreto de potássio
LASER	Light amplification by stimulated emissions of radiation
LIN	Linearidade
LLLT	Low level laser therapy (Laser terapia de baixa intensidade)
MASER	Microwave amplification by stimulated emissions of radiation
MgCl <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O	Cloreto de magnésio hexahidratado
MITO	Mito Track Green FM®
mL	Militro
MPRO	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
mW	Miliwatts
n	Número de unidades experimentais
NaCl	Cloreto de sódio
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio monohidratado
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
Nd:YAG	Neodymium: yttrium aluminium garnet
nm	Nanômetro
P	Nível de significância
pH	Concentração de íons de hidrogênio
PI	Iodeto de propídeo
PIAI	Membrana plasmática íntegra e acrossoma íntegro
PIAL	Membrana plasmática íntegra e acrossoma lesado
PLAI	Membrana plasmática lesada e acrossoma íntegro
PLAL	Membrana plasmática lesada e acrossoma lesado
PNA	Aglutinina de amendoim ( <i>Arachis hypogea</i> )
PSA	Aglutinina de <i>Psium sativum</i>
PVA	Álcool polivinílico
SAS	Statistical analysis sistem
sptz	Espermatozóides
STR	Retilinearidade

TALP	Meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato
TN	Transferência nuclear
UV	Ultravioleta
VAP	Velocidade de trajeto
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade progressiva
W	Watts

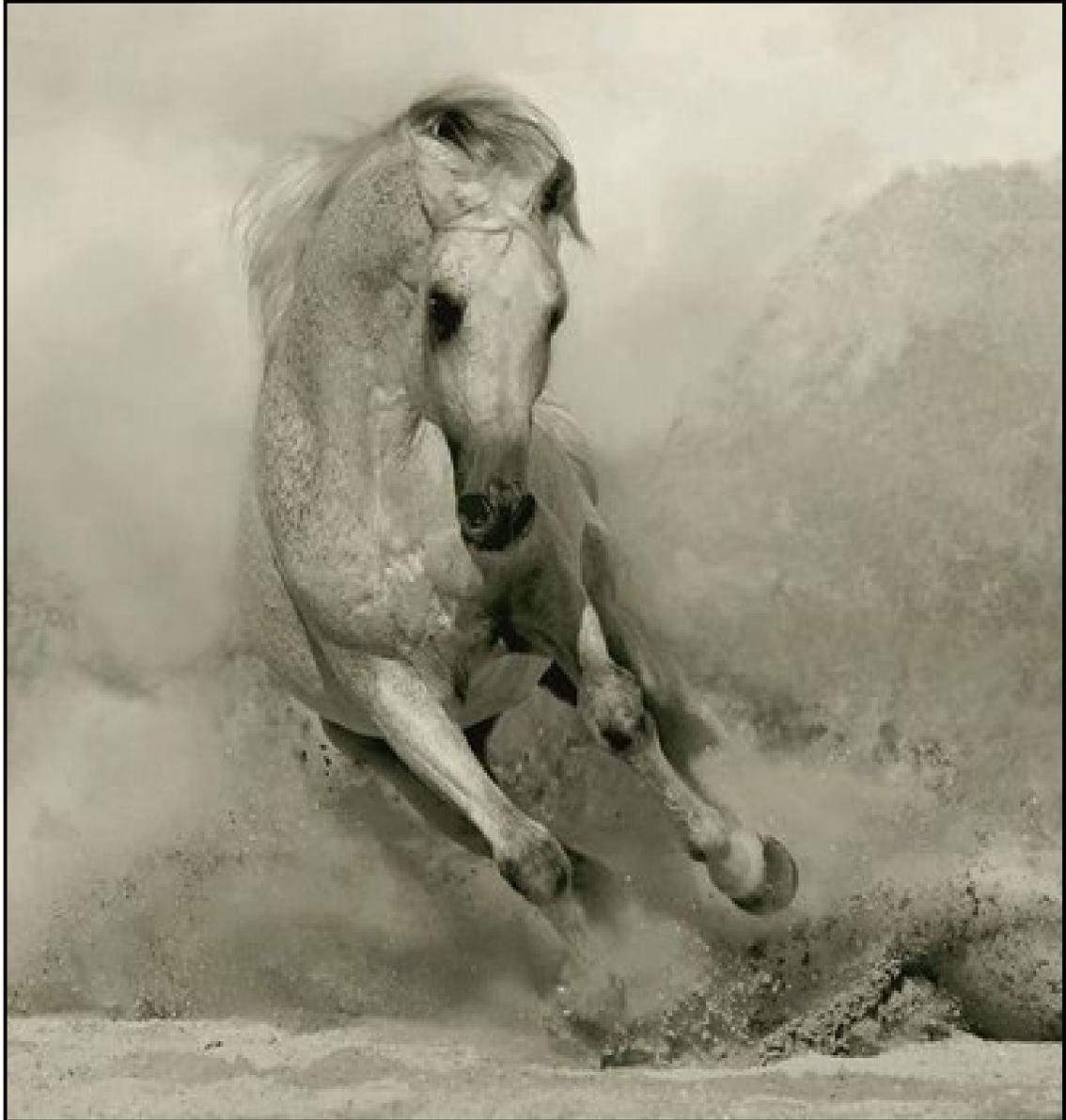
## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<	Menor que
>	Maior que
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
±	Mais ou menos
=	Igual
+	Mais/positivo
°	Grau
-	Menor/negativo
®	Marca registrada
X	Vezes
10 <sup>6</sup>	Milhões
:	Para (1:100)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>29</b>
4.1	BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO EQUINA.....	29
4.2	CRIOPRESERVAÇÃO DO ESPERMATOZÓIDE EQUINO.....	31
4.3	AVALIAÇÃO DO SÊMEN EQUINO.....	33
4.4	INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	35
<b>4.4.1</b>	<b>Integridade da membrana plasmática.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Integridade da membrana acrossomal.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Potencial de membrana mitocondrial.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Associações das sondas fluorescentes.....</b>	<b>39</b>
4.5	APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA REPRODUÇÃO.....	39
<b>4.5.1</b>	<b>Conceitos básicos.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Formação da luz.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Tipos de laser.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5.4</b>	<b>Modos de emissão e cálculo da dose de laser.....</b>	<b>42</b>
<b>4.5.5</b>	<b>Propriedades do laser.....</b>	<b>42</b>
<b>4.5.6</b>	<b>Mecanismo de interação com os tecidos e uso em reprodução animal.....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>48</b>
5.1	LOCAL.....	48
5.2	ANIMAIS.....	48

5.3	COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN.....	48
5.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	49
5.5	AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DAS CARACTERÍSTICAS DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO (Computer Assisted Semen Analysis - CASA).....	52
5.6	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL E POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL PELA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	53
<b>5.6.1</b>	<b>Análises das amostras pela citometria de fluxo.....</b>	<b>53</b>
5.7	PREPARAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN.....	55
<b>5.7.1</b>	<b>Centrifugação.....</b>	<b>55</b>
<b>5.7.2</b>	<b>Concentração espermática.....</b>	<b>56</b>
<b>5.7.3</b>	<b>Ressuspensão do sedimento espermático.....</b>	<b>56</b>
<b>5.7.4</b>	<b>Envase do sêmen.....</b>	<b>56</b>
<b>5.7.5</b>	<b>Criopreservação do sêmen.....</b>	<b>56</b>
5.8	DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN.....	57
5.9	LASER E PROCEDIMENTO DE IRRADIAÇÃO.....	57
<b>5.9.1</b>	<b>Pré-experimento.....</b>	<b>57</b>
<b>5.9.2</b>	<b>Experimento.....</b>	<b>58</b>
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>60</b>
6.1	ANÁLISE DO SÊMEN FRESCO.....	60
6.2	ANÁLISE DO SÊMEN CONGELADO.....	63
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
	REFERÊNCIAS .....	75
	ANEXOS.....	83



---

*1 Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda nos sistemas de criação eqüina levou a necessidade do desenvolvimento de técnicas que possibilitassem melhor aproveitamento do potencial produtivo e reprodutivo de várias espécies domésticas. Dentre as distintas biotécnicas, a inseminação artificial foi a que obteve maior sucesso, devido ao potencial de difusão de material genético, ao melhoramento animal e ao controle de doenças sexualmente transmissíveis (CELEGHINI et al., 2004).

O uso de sêmen congelado na inseminação artificial tem aumentado na criação eqüina. Porém, a capacidade fecundante dos espermatozóides criopreservados de alguns garanhões é baixa quando comparado à *in natura* ou à do refrigerado (SAMPER et al., 1991).

A dificuldade de se avaliar, de forma precisa, a fertilidade do sêmen eqüino é um fator limitante para o desenvolvimento de novas tecnologias de criopreservação do espermatozóide. As técnicas de avaliação de sêmen são laboriosas e onerosas, sendo muitas vezes analisada apenas a motilidade das amostras de sêmen por ser fácil e rápida, todavia essa análise não é capaz de determinar defeitos celulares e possui baixa correlação com a fertilidade do reprodutor (ALLEN, 2005).

A porcentagem de células espermáticas com as membranas plasmática e acrossomal intactas são mais correlacionadas com fertilidade do que a motilidade espermática (WILHELM et al., 1996; NAGY et al., 2003).

Variáveis espermáticas, tais como motilidade, função de organelas, viabilidade, status acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, estrutura da cromatina podem ser avaliadas simultaneamente com o uso da técnica da citometria de fluxo, a qual possibilita a avaliação de milhares de espermatozóides em menos de um minuto (THOMAS et al., 1998).

O espermatozóide é o gameta masculino responsável por carregar o material genético até o ovócito durante a fecundação. Por esta razão, a motilidade é muito importante, sendo esta movimentação flagelar sensível às alterações externas ou internas. A mitocôndria espermática parece ter papel importante na produção de energia para a movimentação da cauda do espermatozóide. De uma forma funcional, o espermatozóide precisa administrar esta energia para percorrer o trato genital feminino (ALBERTS, 1997).

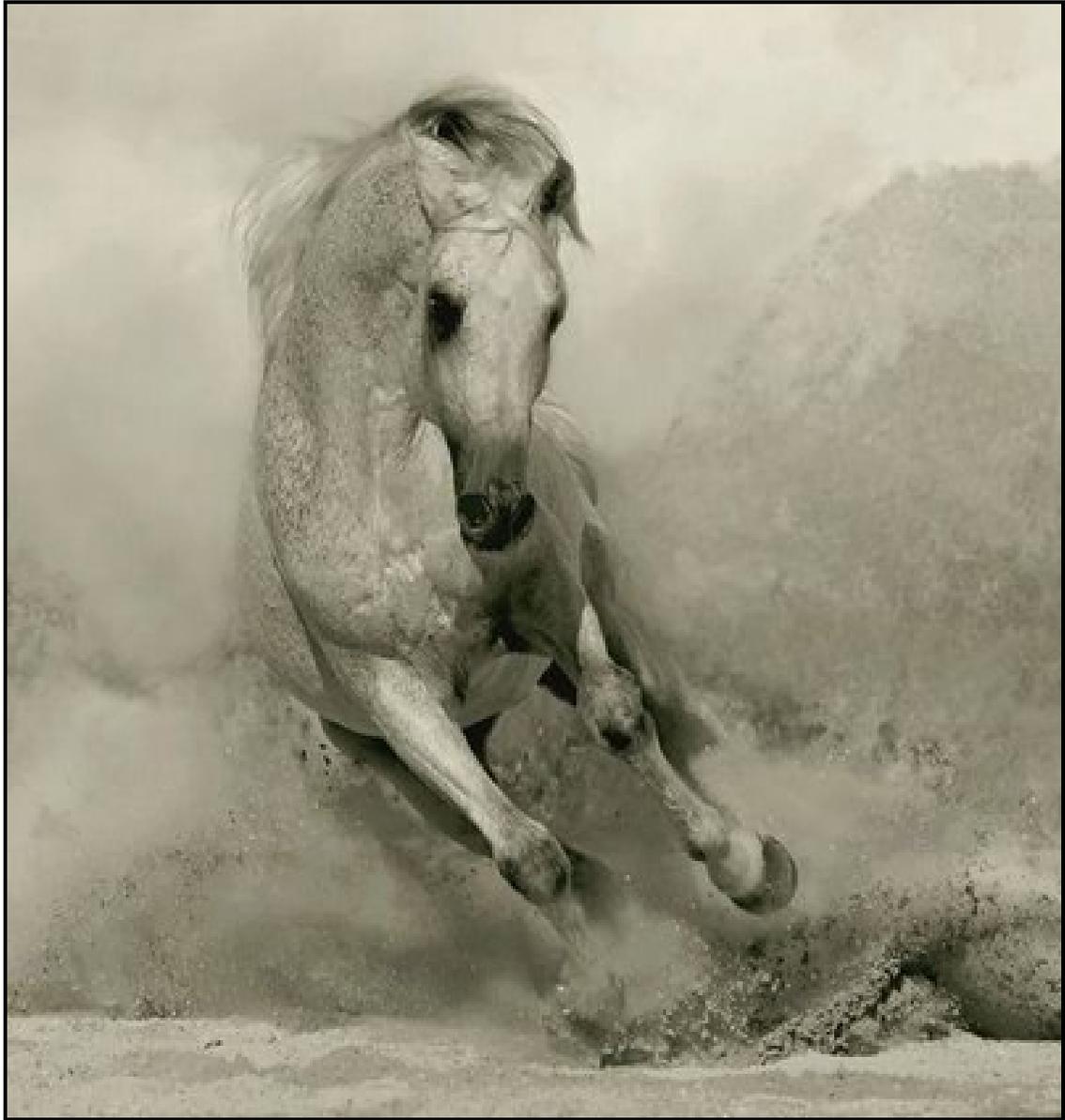
Sabe-se que a luz em forma de energia eletromagnética (fóton) é absorvida por vários tipos celulares que possuem cromóforos. Um exemplo disso é a membrana mitocondrial que atua como ferramenta de biomodulação. Os citocromos provenientes do interior da



mitocôndria absorvem distintos comprimentos de onda, sintetizando ATP de forma direta ou via outro sinalizador celular.

O uso clínico da terapia com laser de baixa intensidade tem sido amplamente utilizado em diferentes modalidades terapêuticas. Em reprodução existem muitos estudos que utilizam o laser para imobilizar os espermatozoides, entretanto poucos foram conduzidos no intuito de estimulá-los para aprimorar a motilidade pré-fecundação.





---

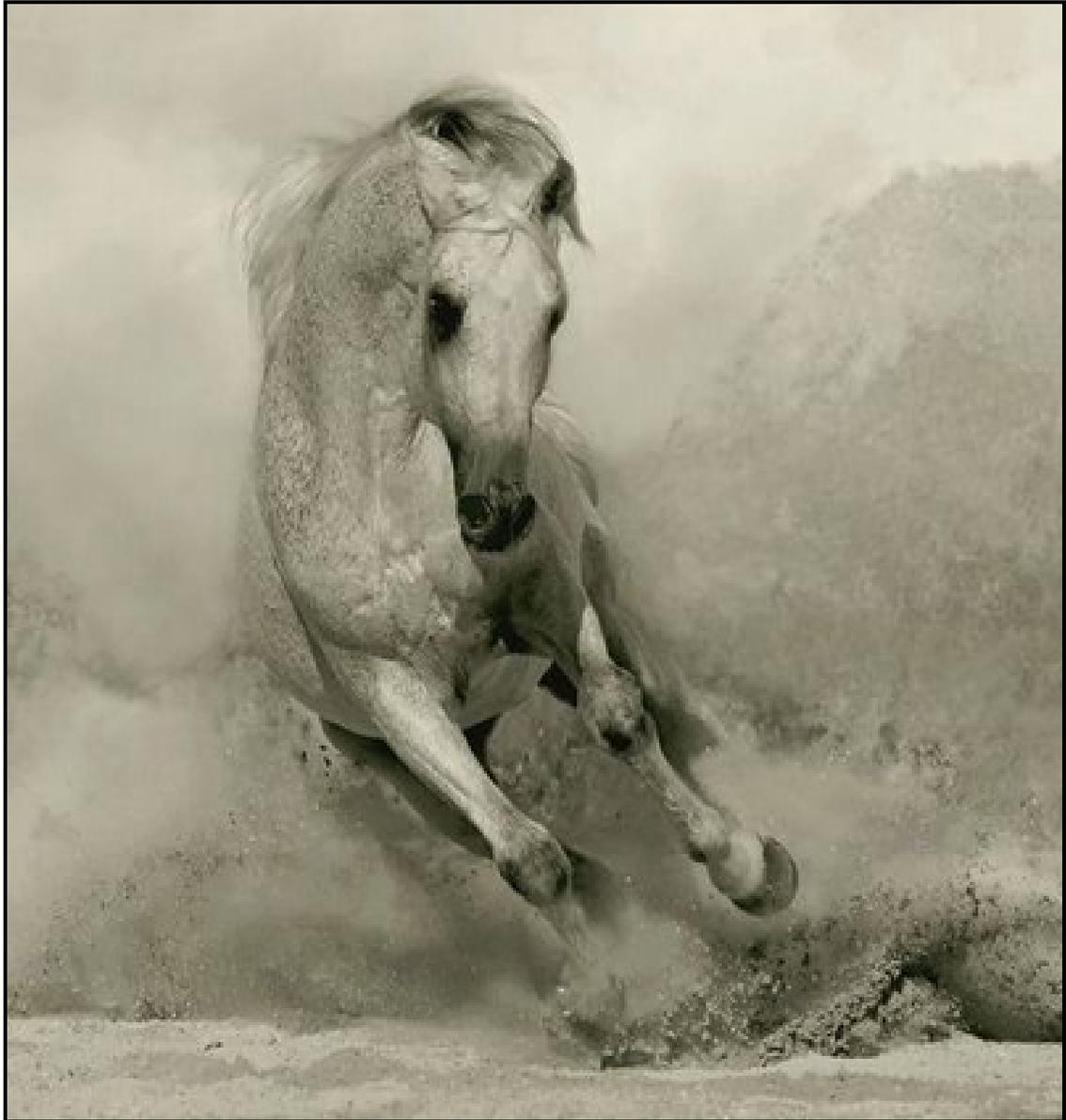
*2 Objetivo*

## 2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivos:

- 1) Analisar os efeitos do laser diodo (650nm de irradiação contínua) sobre a motilidade espermática, a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial do espermatozóide equino fresco, criopreservado e incubado por duas horas pós-descongelamento.
- 2) Determinar qual o melhor momento de aplicação do laser no sêmen: antes ou após a congelamento.





*3 Hipótese*

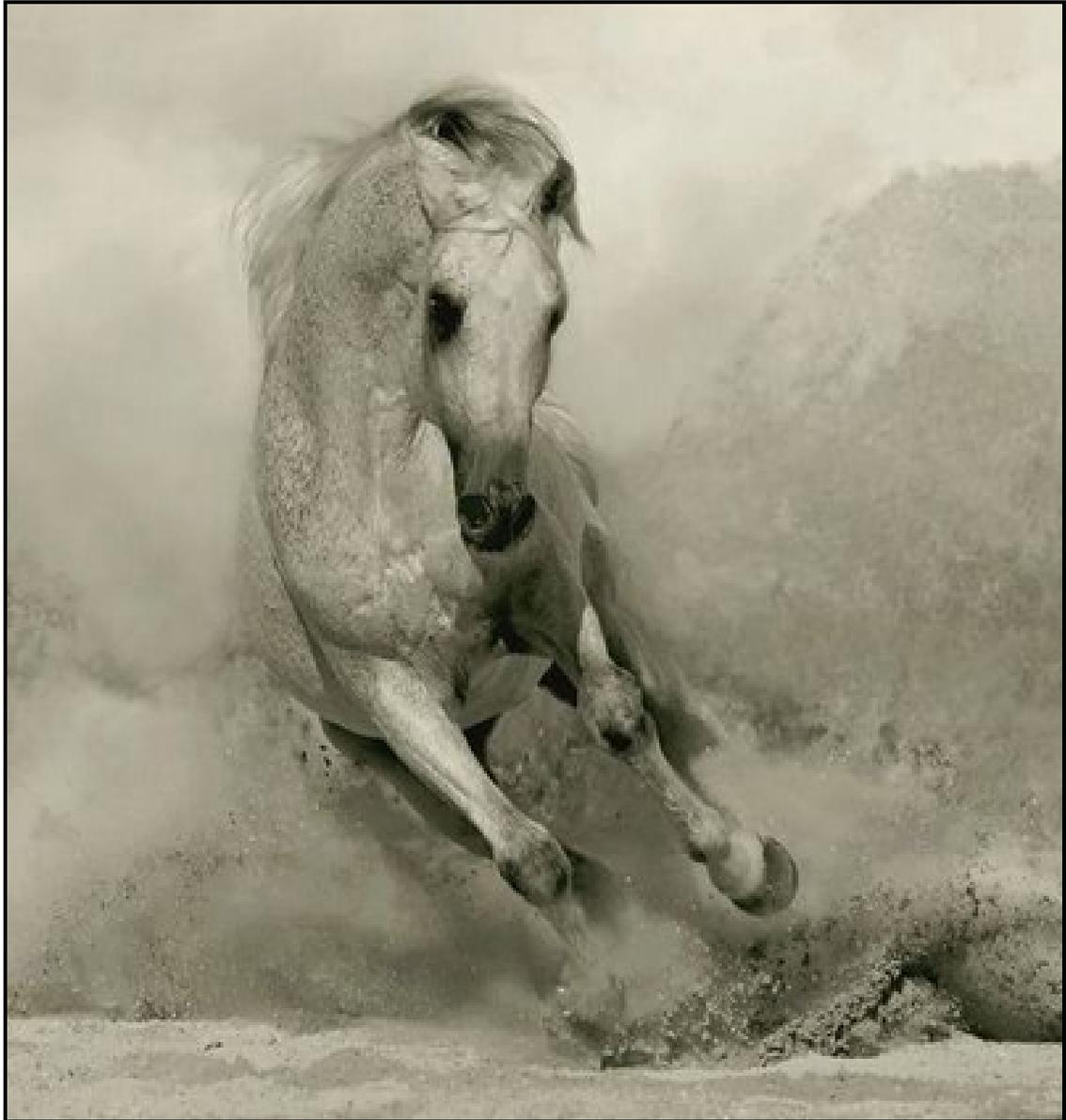
---

### **3 HIPÓTESE**

A aplicação do laser de baixa intensidade estimula o movimento espermático e mantém a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial após a criopreservação.

A aplicação do laser antes da congelação, melhora a motilidade e protege o espermatozóide contra as crioinjúrias.





*4 Revisão de Literatura*

---

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO EQUINA

Embora a espécie equina tenha sido a primeira a se beneficiar com a técnica de inseminação artificial, as biotécnicas de reprodução assistida têm tido maior progresso em outras espécies domésticas, com grandes avanços nos últimos 20 anos (ALLEN, 2005).

Dentre as biotécnicas utilizadas em Medicina Veterinária, a fecundação *in vitro* (FIV) convencional é pouco utilizada na espécie equina. Já a inseminação artificial com baixas concentrações de espermatozóide, via histeroscopia; a sexagem de espermatozoides de garanhões pela ativação fluorescente; a congelamento de embriões; a colheita de oócitos guiado por ultra-som transvaginal; a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) para fecundação; a transferência de gameta intrafalopiana (GIFT) e mais recentemente a transferência nuclear (TN) na clonagem são técnicas empregadas nesta referida espécie. Estes últimos, despertando grande interesse da indústria equina de esporte, por permitir multiplicar grandes campeões (ALLEN, 2005; CHOY et al., 2006).

Para que a inseminação artificial possa apresentar melhores resultados na espécie equina é necessário um estudo mais amplo sobre os vários aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática e à melhoria dos testes aplicados para analisar a viabilidade dos espermatozoides. A refrigeração, congelamento e descongelamento causam prejuízos nas funções celulares, resultando em redução da fertilidade (ARRUDA et al., 2005).

A integridade da membrana espermática exerce papel crítico na sobrevivência do espermatozóide no trato genital feminino. Nos indivíduos que possuem espermatozoides com acrossomo muito pequeno (rato, homem e cavalo), não é possível visualizar danos acrossomais usando microscopia óptica. Assim, técnicas de marcação específica são usadas para visualizar o acrossomo com microscópio óptico ou microscopia de fluorescência. Os métodos de coloração empregando corantes fluorescentes (sondas fluorescentes ou fluorocromos) aumentaram a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides. As sondas fluorescentes são utilizadas isoladamente ou em combinação para determinar a integridade e a viabilidade celular (KARESKOSKI et al., 2006; ARRUDA et al., 2005).



Embora o uso de sondas fluorescentes pela microscopia venha sendo um método para a avaliação dos compartimentos celulares, o número de espermatozóides normalmente examinados por análise, não excede a 200. A citometria de fluxo surge como uma técnica vantajosa sobre as clássicas para a avaliação da viabilidade e da integridade espermática, uma vez que este sistema automatizado tem a capacidade de examinar 10.000 a 30.000 espermatozóides em menos de um minuto, permitindo maior exatidão nos resultados e diminuição no tempo de preparação requerido em outras técnicas fluorescentes (ARRUDA, 2000).

Melhorias em diluidores e crioprotetores trouxeram benefícios no transporte do sêmen e na inseminação artificial utilizando sêmen equino refrigerado ou congelado. Paralelamente, houve também melhorias na indução de ovulação, sincronização do estro, uso de gonadotrofinas exógenas estimulando múltiplas ovulações férteis, métodos mais eficientes para a transferência de embriões pelo método não cirúrgico em éguas receptoras, associado com a diminuição de restrições das associações de criadores tornando possível a aplicação destas técnicas em cavalos atletas, sendo o Puro Sangue Inglês ainda uma exceção, não por uma diferença da raça, mas sim por uma norma da Associação de Criadores (ALLEN, 2005).

A técnica de inseminação artificial pode ser aprimorada em vários aspectos. Pode-se fracionar o ejaculado e usar somente o primeiro jato rico em espermatozóides; pode-se remover totalmente o plasma seminal ou reduzir a proporção do mesmo pela diluição do sêmen; o volume inseminado pode variar de 0,2 a 100 mL; a dose inseminante usual varia de 5 a 500 x 10<sup>6</sup> espermatozóides progressivos. Até mesmo o local da deposição do sêmen pode ser diversificado. O mesmo pode ser depositado no corpo do útero, mas com o uso de sêmen sexado ou baixas doses de sêmen, o depósito deve ser no corno uterino ipsilateral ao folículo pré-ovulatório usando uma guia transvaginal ou depositado na junção útero tubárica usando histeroscópio. O sêmen pode ser usado *in natura* logo após a colheita, ou pode ser diluído e refrigerado para ser usado em até 48h, ou ainda pode ser criopreservado e armazenado em nitrogênio líquido (KATILA, 2005).

As técnicas reprodutivas disponíveis no mercado apresentaram um impacto positivo na indústria de eqüinos na última década. Algumas destas tecnologias têm sido incorporadas à criação de eqüinos (baixa dose inseminante e transferência de embriões), enquanto outras possuem aplicação mais lenta (colheita de oócitos, ICSI, GIFT, TN e FIV). A utilização destas técnicas depende do sucesso da tecnologia, atitudes dos criadores e veterinários comparados ao custo benefício da mesma (SQUIRES, 2005).



## 4.2 CRIOPRESERVAÇÃO DO ESPERMATOZÓIDE EQUINO

A inseminação artificial em cavalos foi estabelecida a muitos anos estando mais difundida nos dias atuais. Contudo, o sucesso da estocagem do sêmen para inseminação artificial é fator determinante na criação de eqüinos. A preservação do espermatozóide tem efeito negativo na qualidade do sêmen. A preferência pela preservação em forma líquida é maior quando comparado à forma congelada. Porém, a viabilidade do sêmen refrigerado a 4-6°C é limitada a até 72h. No entanto, a criopreservação do sêmen permite a utilização deste material na inseminação artificial por tempo indeterminado, desde que corretamente armazenado em botijão criogênico (BLOTTNER et al., 2001).

Em 2000, a Associação Americana de Cavalo Quarto de Milha (AQHA) e a Associação Americana de Paint Horse (APHA) permitiram a inscrição de potros nascidos por inseminação artificial com sêmen congelado. A AQHA e APHA juntas tinham 5,1 milhões de cavalos registrados com aproximadamente 300.000 éguas a cada ano. Criadores têm preferido transportar sêmen refrigerado ou congelado para realizar a inseminação artificial pelo benefício justaposto, a transportar valiosas éguas e potros até garanhões para a cobertura natural. O acesso ao sêmen de eqüinos que estão no exterior, em competição, doentes, feridos ou sendo utilizados em estação de monta natural fica mais fácil somado aos benefícios do sêmen congelado (LOOMIS; SQUIRE, 2005).

Os animais possuem procriação sazonal que assegura o nascimento no momento mais apropriado do ano. No eqüino, o ritmo circanual de reprodução ocorre por mudanças no fotoperíodo. Em dias curtos, na égua, ocorre a diminuição da secreção de gonadotrofinas e diminuição da atividade ovariana. A ausência de atividade cíclica talvez seja o resultado de uma falta de sinais positivos, já em dias longos, condições climáticas e nutricionais favoráveis, a presença do garanhão estimula a secreção de GnRH e de gonadotrofinas. O cavalo é uma espécie poliéstrica sazonal com começo da estação reprodutiva acontecendo na primavera, associado com aumento da luz do dia, temperatura e disponibilidade de alimento (NAGY et al., 2000).

Diminuição nas variáveis seminais motilidade, concentração espermática, função testicular germinativa são relatadas na estação não reprodutiva, em função da atividade endócrina (HOFFMANN; LANDECK, 1999; BRANDÃO et al., 2006).



Atualmente, os protocolos de criopreservação não são unificados e o sucesso bastante variável. Um dos pré-requisitos para o sucesso da criopreservação do sêmen equino é a alta qualidade inicial, a qual apresenta diferenças entre garanhões, idade reprodutiva e época do ano (BLOTTNER et al., 2001).

A criopreservação requer muitos passos como colheita, primeira diluição, centrifugação, diluição para congelamento, refrigeração, congelamento e descongelamento, que interativamente afetam o sucesso final (VIDAMENT et al., 2001).

O uso de gel lubrificante solúvel em água em vagina artificial para colheita de sêmen equino, causa no ejaculado um rápido aumento na osmolalidade, reduzindo a motilidade espermática. A ejaculação retrógrada com exposição à urina durante a colheita de sêmen equino também ocasiona aumento da osmolalidade. Esta perda de motilidade do espermatozóide é permanente e não há recuperação da iso-osmolalidade (BALL; VO, 2001; DEVIREDDY et al., 2002).

Para um espermatozóide fecundar o ovócito, precisa reter pelo menos quatro atributos gerais depois da descongelamento: a) metabolismo para produção de energia; b) motilidade progressiva; c) enzimas, situadas dentro do acrossoma, essenciais para a penetração do espermatozóide no oócito; d) proteínas na membrana plasmática importante para sobrevivência do espermatozóide dentro do sistema reprodutor feminino (AMANN; PICKETT, 1987).

Quando uma suspensão de espermatozóides é resfriada até 0°C, cristais de gelo começam a formar no meio extracelular. Isto resulta em um aumento da concentração de sais no fluido extracelular. A água de dentro do espermatozóide sai para o ambiente extracelular tornando-os progressivamente desidratados. Se a água não deixar o espermatozóide, ocorre a formação de gelo intracelular causando dano ao espermatozóide como movimentos circulares, perda de motilidade e componentes intracelulares (AMANN; PICKETT, 1987; DEVIREDDY et al., 2002).

Os diluidores usados para a criopreservação de espermatozóides equino, usualmente contêm gema de ovo, açúcares, eletrólitos e crioprotetores. Lipídeos, lipoproteínas e outros aditivos têm sido adicionados para prevenir o choque térmico por baixa temperatura e defeitos de refrigeração (HEITLAND et al., 1996).

As mudanças estruturais causadas pela congelamento, tais como, lesões das membranas plasmática e/ou acrossomais, liberação de enzimas pelos espermatozóides, lesões nucleares e



mitocondriais determinam o escoamento de fosfolipídios, proteínas intracelulares e perda de mitocôndrias pelos espermatozóides (BRAUN et al., 1995).

#### 4.3 AVALIAÇÃO DO SÊMEN EQUINO

Os garanhões são frequentemente avaliados quanto ao potencial de fertilidade antes da venda, durante a reprodução sazonal, ou em casos de suspeita de infertilidade. O sêmen é usualmente avaliado para verificar a eficiência reprodutiva de garanhões usados em programas de inseminação artificial, e selecionado aqueles passíveis de serem refrigerados ou criopreservados (JASKO et al., 1992).

A grande dificuldade no desenvolvimento de novas tecnologias de criopreservação de espermatozóides eqüinos está na avaliação da fertilidade destas células. Para contornar este problema, ensaios laboratoriais como determinações da motilidade espermática são utilizados como método rápido de avaliação do sêmen, entretanto não predizem os danos celulares que podem ocorrer durante a criopreservação (GRAHAN, 1996).

Avaliações de amostras de sêmen congelado correlacionando motilidade com potencial fecundante são pouco freqüentes tanto em touros (BUDWORTH et al., 1988; WHITFIELD; PARKINSON, 1995) como em garanhões (SAMPER et al., 1991; DIGRASSIE et al., 2000). As porcentagens de células com as membranas plasmática e acrossomal intactas são mais fortemente relacionadas com a fertilidade do que com a motilidade, porém estas análises predizem apenas a penetração do espermatozóide no oócito e não o sucesso durante o desenvolvimento embrionário. (GRONDAHL et al., 1994; WILHELM et al., 1996).

Ensaio laboratoriais avaliam a qualidade de amostras de sêmen antes da inseminação artificial envolvendo a avaliação da porcentagem de espermatozóides móveis (subjetivos ou computadorizados), porcentagem de espermatozóides com morfologia normal e concentração da dose. O objetivo principal de todas as análises de sêmen é tentar prever a fertilidade de uma amostra (GILLAN et al., 2005).

Por esta razão, a avaliação automatizada da motilidade é de grande interesse pelo fato da cinética espermática determinar o potencial fecundante dos espermatozóides. Dentre esses parâmetros, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido



correlacionados com penetração no muco cervical, penetração em oócitos de hamster e resultados de fecundação *in vitro* (CENTOLA, 1996; JANUSKAUSKAS et al., 1999).

As variáveis de motilidade computadorizada dos espermatozóides de garanhões foram estudadas após duas colheitas consecutivas (FERREIRA et al., 1997). Não houve diferença significativa de motilidade ( $P>0,05$ ) entre o primeiro e o segundo ejaculado dos garanhões. Os autores concluíram que o método de análise computadorizada mostrou ser prático, rápido e de fácil execução. Contudo, segundo os autores, determinar qual ou quais variáveis analisadas pode contribuir para a inferência do potencial fecundante do sêmen é um desafio.

Com o intuito de avaliar a integridade do acrossomo e também as variáveis da motilidade por sistema computadorizado, Blach et al. (1989) congelaram o sêmen de garanhões com diluidor à base de EDTA-lactose-gema (4% de glicerol). Após a descongelação, a porcentagem de acrossomos intactos foi de 75,8%; motilidade progressiva de 23,3%; velocidade curvilínea de 62,6  $\mu\text{m/s}$ ; velocidade progressiva de 37,6  $\mu\text{m/s}$ ; linearidade de 6,1 %; amplitude lateral de cabeça de 2,1  $\mu\text{m}$  e frequência de batimentos de 17,3 Hz. Para a maioria das variáveis estudadas houve diferença significativa entre garanhões e entre ejaculados colhidos do mesmo garanhão.

Papa et al. (2008) investigaram o efeito de diferentes diluidores e meios capacitantes na pré-congelação de espermatozóides epididimais de equinos. Os autores testaram 3 diluidores na congelação de espermatozóides (Botu-Crio®, EDTA-lactose e INRA-82), sendo as amostras avaliadas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA). O Botu-Crio® demonstrou melhor motilidade em relação aos demais, entretanto não houve diferença entre os tratamentos em relação à integridade da membrana plasmática. Avaliaram também o efeito do tempo de incubação dos espermatozóides epididimais em meio capacitante antes da congelação (Fert TALP, TALP sperm, TALP + progesterona). As amostras incubadas no meio TALP sperm apresentaram melhores valores de motilidade pós-descongelação em relação aos outros meios.

A capacidade fecundante do espermatozóide depende do potencial desta célula em ser hiperativada, capacitada no momento da junção com o oócito, com o acrossoma intacto para então sofrer a reação acrossômica, estar apta a penetrar a zona pelúcida do oócito e possuir um DNA íntegro para a formação de um embrião com a capacidade de se desenvolver. A descoberta de fluorocromos e componentes conjugados às sondas fluorescentes possibilitam melhor qualidade da análise do sêmen no aspecto bioquímico, ultra-estrutural e funcional. Entretanto, células espermáticas quando analisadas por microscopia óptica comum ou de



epifluorescência, somente um pequeno número de uma determinada população é avaliado, o que demanda tempo, resultados muitas vezes subjetivos e mensuração separada dos atributos espermáticos. A adaptação destas sondas fluorescentes para a avaliação destas células pela técnica de citometria resultou numa maior acurácia e rapidez, podendo-se avaliar várias características espermáticas em grande escala (GILLAN et al., 2005).

Vários atributos espermáticos podem ser analisados simultaneamente com o uso da citometria de fluxo, fazendo correlações entre ensaios obtidos em laboratório e a fertilidade de sêmen congelado de touro e garanhão (KIRK et al., 2005).

A técnica de citometria de fluxo mensura células em suspensão, uma a uma em várias direções, em poucos minutos. Analisa todas as sub-populações das amostras, sendo ideal para populações heterogêneas, como os espermatozóides. A citometria de fluxo na avaliação seminal iniciou para mensurar conteúdos do DNA (EVENSON et al., 1980), sendo que sua aplicação aumentou gradualmente nos últimos anos. Hoje, a citometria de fluxo é aplicada para avaliar espermatozóides quanto à viabilidade, integridade acrossomal, função mitocondrial, capacitação espermática, fluidez da membrana plasmática e status do DNA. Corantes fluorescentes e novas técnicas são continuamente desenvolvidas para aplicação em citometria de fluxo (GILLAN et al., 2005).

#### 4.4 INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.

##### 4.4.1 Integridade da membrana plasmática

A membrana plasmática do espermatozóide é uma dupla camada lipídica, contendo fosfolipídios polares que são ácidos graxos polinsaturados responsáveis pela fluidez da membrana, proteínas, carboidratos, esteróis, sendo neste caso o colesterol o principal e glicolipídios (GRAHAM, 1996; FLESCHE; GADELLA, 2000).

A membrana plasmática é responsável pelo equilíbrio osmótico celular, funcionando como barreira entre o meio intra e extracelular. Danos na membrana plasmática podem levar a



perda da homeostasia e conseqüente morte celular (AMANN; PICKETT, 1987; AMANN; GRAHAM, 1993).

A membrana plasmática circunda toda a célula espermática unindo organelas e componentes intracelulares. Devido às características de semipermeabilidade, mantém o gradiente químico de íons e outros componentes solúveis. Possui proteínas específicas que facilitam o transporte de glicose e frutose do ambiente extracelular. Estes transportadores são substratos de fonte de energia indispensáveis para a sobrevivência da célula (SILVA; GADELLA, 2006).

Em temperatura corpórea fisiológica, a membrana plasmática se encontra na forma de mosaico fluido, na qual as proteínas estão livres para se moverem entre os fosfolipídios bilaterais que conferem funcionalidade à membrana (JASKO et al., 1992). Quando ocorre redução da temperatura, os lipídios passam do estado fluido, no qual as cadeias de ácidos graxos estão desorganizadas, passando para estado de gel, tornando as cadeias de ácidos graxos rígidos e paralelos (AMANN; GRAHAM, 1993).

Quando o espermatozóide eqüino é resfriado abaixo de 18 °C, os fosfolipídios da membrana sofrem uma transição da fase líquida para a fase gel. Durante esta transição, os fosfolipídios da membrana plasmática aumentam a permeabilidade da membrana, resultando em rompimento da mesma e morte celular. Estudos prévios (PARKS; LYNCH, 1992) indicam que a relação de colesterol/fosfolipídios da membrana plasmática confere maior fluidez e estabilidade durante a criopreservação. O colesterol mantém o estado de fluidez em baixas temperaturas reduzindo danos na membrana (SILVA; GADELLA, 2006).

Quando o colesterol é acrescentado às membranas lipossomais sintéticas, em baixas temperaturas e em concentrações altas, elimina esta transição de fase completamente. O colesterol pode ser incorporado facilmente à membrana plasmática de células usando ciclodextrinas (CLC). As ciclodextrinas são solúveis em água, tem um centro hidrofóbico e pode transportar colesterol para dentro ou fora das membranas de acordo com o gradiente de concentração. Quando o colesterol foi incorporado à CLC e acrescido ao sêmen bovino antes da criopreservação, porcentagens mais altas de motilidade e de membrana plasmática intacta foram recuperadas depois da descongelação comparada ao sêmen sem tratamento (PURDY; GRAHAN, 2004).

Estudos semelhantes mostraram que a adição de colesterol aos espermatozóides eqüinos antes da criopreservação, aumentou a porcentagem de espermatozóides móveis e com



membrana intacta, aumentando a habilidade dos espermatozoides de se aderirem à zona pelúcida (MOORE; SQUIRE; GRAHAM, 2005).

A integridade da membrana é avaliada com o uso de corantes impermeáveis, assim células que não emitem fluorescência indicam membrana plasmática intacta. Várias sondas fluorescentes impermeáveis à membrana com afinidade pelo DNA são usadas com este propósito. Foram testadas diferentes sondas em células espermáticas com excitação e propriedades de emissão distintas. O Hoeschst 33258 (em 358/488 nm de comprimento de onda); o YoPro-1 (em 488/515 nm de comprimento de onda), o iodeto de propídio ou o ethidiumhomodimer-1 (488 e 568 / >620 nm de comprimento de onda, respectivamente); o ToPro-3 e TOTO (647/670 nm de comprimento de onda) são exemplos destas sondas (SILVA; GADELLA, 2006).

Existem sondas acetiladas, que contém radicais acetil que atravessam a membrana intacta, sendo imediatamente desacetiladas por esterases intracelulares tornando a sonda impermeável. Portanto, células com membrana plasmática intactas ficam coradas, mas é possível a coloração de células com membrana lesada. O diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o SYBR-14 são exemplos destes tipos de sondas fluorescentes. É possível fazer associações das sondas CFDA ou SYBR-14 com PI ou EthD-1 para detectar membranas plasmáticas intactas ou lesadas (SILVA; GADELLA, 2006).

#### 4.4.2 Integridade da membrana acrossomal

O acrossoma é uma vesícula grande, originária do complexo de Golgi da espermátide, que contém enzimas hidrolíticas responsáveis pela penetração do espermatozoide na zona pelúcida do ovócito para completar a fecundação (EDDY; O'BRIEN, 1994; FLESCHE; GADELLA, 2000). Está localizado na porção posterior da cabeça do espermatozoide, entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo. Os componentes do citoesqueleto estão alojados nos espaços estreitos entre o acrossomo e o núcleo e entre o acrossomo e a membrana plasmática (EDDY; O'BRIEN, 1994).

A reação acrossômica, caracterizada pela liberação das enzimas acrossomais é um evento importante para a penetração do espermatozoide através da zona pelúcida do ovócito e sua fusão com a membrana plasmática do oócito (DIAZ-PEREZ, 1988). Portanto, a



integridade do acrossomo é pré-requisito para a fecundação (EDDY; O'BRIEN, 1994; FLESCHE; GADELLA, 2000).

Para a determinação da integridade do acrossoma utilizam-se as lecitinas conjugadas aos fluoróforos (marcadores de lisossomos) ou a anticorpos anti-proteína intra-acrossomal (anti-CD46). As lecitinas conjugadas se ligam às cadeias de carboidratos glicoprotéicos presentes no acrossoma (SILVA; GADELLA, 2006). As lecitinas mais utilizadas são *Psium sativum* (PSA), *Arachis hypogea* (PNA) e *Concanavalia ensiformis* (ConA). Dentre os fluoróforos conjugados às lecitinas está o isotiocionato de fluoresceína (FITC) (SILVA; GADELLA, 2006).

#### 4.4.3 Potencial de membrana mitocondrial

Nas células espermáticas, as mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária. Possui como principal função a produção de ATP por fosforilação oxidativa promovendo o batimento flagelar da cauda do espermatozóide (COSSON, 1996).

A cauda do espermatozóide é a parte responsável pela movimentação, sendo uma estrutura complexa que reflete mudanças rápidas de função. Neste sentido, umas das características dos espermatozóides de mamíferos é a fusão da mitocôndria com a bainha mitocondrial, que está localizada na porção apical da cauda (EDDY; O'BRIEN, 1994). Muitos relatos indicam direta correlação entre motilidade e atividade mitocondrial (TROIANO et al., 1998), porém o mecanismo como esta relação é estabelecida não está bem compreendido (EDDY; O'BRIEN, 1994).

Há uma variabilidade entre espécies do real papel destas mitocôndrias. Na espécie suína, por exemplo, mais de 95% da síntese de ATP provém da glicólise (mecanismo anaeróbico), ao passo que menos que 1% é proveniente do ciclo de Krebs (aeróbico). Isto parece indicar que a mitocôndria, nesta espécie, possui outro papel além de fornecer energia para manter o batimento do flagelo, como a regulação do fluxo de cálcio e a manutenção do potencial de membrana (ROSSATO et al., 2001).

Devido a estas diferenças, o papel da mitocôndria na motilidade espermática ainda é muito discutido. Os espermatozóides, no ejaculado *in natura*, produzem a maior parte do ATP pela glicólise (produção anaeróbica de ATP), sendo que a bainha fibrosa da cauda contém



enzimas envolvidas na glicólise. A prova disso é que espermatozóides oriundos de camundongos *Knockout* para um gene importante para esta via, são imóveis. Entretanto, as mitocôndrias geram ATP para a peça intermediária e a cabeça dos espermatozóides, necessários para a manutenção das membranas. Assim, a integridade da mitocôndria é essencial para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea ou em técnicas de reprodução assistida (SILVA; GADELLA, 2006).

As sondas mais utilizadas para determinar o potencial de membrana mitocondrial são a Rodamina 123 (R123) e os corantes da linha Mitotraker®: Deep Red, Red, Orange, Green, Orange CMH<sub>2</sub>TMROS, X-Rosamine CM-H<sub>2</sub>XROS e JC-1 (SILVA; GADELLA, 2006).

#### 4.4.4 Associações das sondas fluorescentes

No intuito de se avaliar de forma simultânea as características espermáticas citadas, muitos estudos foram dirigidos associando as diferentes sondas, com o propósito de separar populações de células capazes de fecundar o ovócito (GRAHAM et al., 1990; GARNER et al., 1997; SOUZA, 2001; ARRUDA; CELEGHINI, 2003; ARRUDA et al., 2005; ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007).

Celeghini et al. (2004) validaram a associação das sondas fluorescentes (PI+FITC-PSA+MITO) para a análise simultânea dos atributos integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial de espermatozóides de equinos, pela microscopia de epifluorescência. Esta técnica demonstrou ser de fácil interpretação e preparo.

A associação de sondas fluorescentes também pode ser utilizada pela técnica de citometria de fluxo. A análise é objetiva, avaliando precisamente a quantidade de emissão de fluorescência por célula, podendo ser analisado milhares de células em menos de um minuto, permitindo ainda associações de sondas com comprimento de ondas diferentes (GRAHAM, 2001).



## 4.5 APLICAÇÃO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA REPRODUÇÃO

### 4.5.1 Conceitos básicos

A luz é considerada uma das formas mais antigas de terapia. No século XVI, Herodotus reconheceu a importância do sol para o crescimento dos ossos. Os físicos Celsus (Grécia) e Galeno (Roma) recomendavam banhos de sol para o tratamento de epilepsia, artrite e asma. Isto motivou os cientistas do século XIX a investigarem esta forma de radiação. Em 1877, Downs e Blunt descobriram o efeito bactericida da luz solar, culminando na utilização da radiação ultravioleta (UV) para a esterilização até os dias de hoje (BAXTER, 1994).

Segundo Mikail (2006), a teoria dos quanta publicada por Albert Einstein em 1917 (Zur Quantum Theories der Strahlung) explica o princípio da emissão estimulada de fótons, ou seja, como um átomo pode produzir energia. Entretanto, a fabricação de aparelhos para este fim só ocorreu 40 anos depois.

O primeiro aparelho, utilizando este princípio, chamado de MASER (*Microwave Amplification by Stimulated Emissions of Radiation*) foi fabricado em 1955 por Gordon e colaboradores, na Columbia University, entretanto, este não emitia radiação na faixa visível do espectro eletromagnético. Já em 1960, Theodore Maiman, do Huges Laboratories na Califórnia (EUA), utilizou um aparelho construído à base de Cristal Ruby, que emitia radiação na faixa visível do espectro eletromagnético. O comprimento de onda foi de 694 nm (nanômetros), portanto de cor vermelha. A partir de então, os aparelhos receberam o nome de LASER (*Light Amplification by Stimulated Emissions of Radiation*) (CHARMAN, 1990).

A partir de 1970, as pesquisas se intensificaram, possibilitando a utilização de outras substâncias radioativas e a fabricação de laser cirúrgico (MIKAIL, 2006).

### 4.5.2 Formação da luz

A luz é uma forma de energia eletromagnética que é transmitida por partículas de energia denominadas fótons. Estes fótons caminham em ondas no espaço. Conforme o



comprimento dessas ondas. A luz é representada por uma cor, sendo visível quando presente na faixa entre 400 nm (violeta) e 700 nm (vermelho) do espectro eletromagnético. Em comprimento de onda menor está a luz ultravioleta e em comprimento de onda maior, a luz infravermelha (TUNER; HODE, 2004).

Para que ocorra a emissão de radiação, o aparelho de laser precisa conter uma substância radioativa ou *lasing medium*. Esta substância é capaz de absorver energia de uma fonte externa, mudar de configuração subatômica e emitir fótons. A menor parte dessa substância é o átomo. Cada átomo é composto por partículas fundamentais: prótons e nêutrons no núcleo e elétrons dispostos ao redor, em camadas orbitais com diferentes níveis de energia. Os átomos do *lasing medium* geralmente estão nos orbitais com níveis baixos de energia, ou seja, no estado de repouso (BAGNATO, 2001).

Quando um elétron absorve energia necessária para ir a um orbital com nível mais alto de energia, muda para esse orbital. Quando isso ocorre, o átomo está num estado de excitação. Esta nova estrutura é muito instável, permanecendo pouco tempo nesse estado retornando ao orbital de origem. Ao retornar, libera o excesso de energia na forma de fóton (partícula de luz), a esse fenômeno dá-se o nome de emissão espontânea (BAXTER, 1994; BAGNATO, 2001).

Ao ligar um aparelho Laser, gera-se uma descarga elétrica por meio das quais os elétrons da substância radioativa são estimulados a mudarem de órbita e emitirem fótons. Quando um desses fótons colide com um elétron do átomo vizinho, este também muda de órbita e quando volta ao estado de repouso libera outro fóton, e assim por diante. Estas emissões de fótons são resultantes da estimulação do átomo por um fóton incidente (BAGNATO, 2001; MIKAIL, 2006).

#### 4.5.3 Tipos de laser

Os tipos de laser são nomeados de acordo com o tipo de substância radioativa. Estas substâncias podem estar na forma de cristais sólidos, como o ruby sintético (*neodymium: yttrium aluminium garnet* – **Nd:YAG**), na forma de gases, como o *helium néon* (HeNe) e o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) ou na forma de semicondutores diodos, como *gallium arsenide* (GaAs) e *gallium aluminium arsenide* (GaAIAs). A substância radioativa e o comprimento de



onda que emite vão definir o nome comercial, as características da luz, a potência e as propriedades terapêuticas do equipamento (ENWEMEKA, 1988).

O laser pode ser classificado como de baixa potência (laser terapêutico) e como de alta potência (laser cirúrgico). Os lasers terapêuticos emitem baixa energia; portanto com efeitos biomoduladores e não-térmicos. Os lasers cirúrgicos emitem maior energia, capazes de cortar, coagular e vaporizar tecidos (PINHEIRO et al., 2006).

#### 4.5.4 Modos de emissão e cálculo da dose de laser

Os aparelhos podem emitir a luz no modo contínuo ou no modo pulsátil. No modo contínuo, a potência que sai do aparelho é igual à potência do raio. No modo pulsátil, a emissão do raio sofre períodos de interrupção durante o tratamento, portanto a potência do raio vai ser menor do que a do aparelho (BAXTER, 1994; BAGNATO, 2001).

A dosagem tanto para o modo contínuo como pulsátil é calculada em  $J/cm^2$ , na qual  $1 J$  (joule) =  $1 W/s$  (Watts). Para calcular a dose é preciso saber a potência do raio, o tempo e a área do raio. Exemplo: para obtermos a dose de  $1 J/cm^2$  com um aparelho que tem potência do raio igual a  $0,4 mW$ , com  $0,07 cm^2$  de área do raio, a equação utilizada é:

$$\text{Tempo de aplicação} = (1 J/cm^2 / 0,0004W) \times 0,07 cm^2$$

$$\text{Tempo de aplicação} = 175s$$

#### 4.5.5 Propriedades do laser

De acordo com o processo de formação, o laser tem três propriedades que o diferem de uma luz comum: ele é coerente, colimado e monocromático (BAXTER, 1994; BAGNATO, 2001).

Coerente significa que todos os fótons são emitidos no mesmo comprimento de onda, sem perda de energia durante o trajeto do raio. A energia que sai do aparelho é a mesma que chega ao tecido (BAGNATO, 2001).



O fato de ser colimado determina o paralelismo com o qual os raios são posicionados. No laser, estes raios são extremamente paralelos entre si e os fótons caminham na mesma direção. O mesmo diâmetro do foco de luz é mantido desde a saída do aparelho até a chegada ao alvo. A colimação é diferente para cada tipo de laser (MAIYA et al., 2005).

Por ser monocromático, possui apenas um único comprimento de onda, ou seja, uma única cor (PINHEIRO et al., 2006).

#### 4.5.6 Mecanismo de interação com os tecidos e uso em reprodução animal

A terapia laser tem por princípio o emprego de uma fonte luminosa de um único comprimento de onda o qual estimula reações dentro de células. A luz está dentro do espectro vermelho para próximo do infravermelho (>750 nm). A terapia a laser é principalmente usada na redução de dor e melhora na qualidade da cicatrização de feridas. O mecanismo de ação foi atribuído à ativação de componentes mitocondriais, resultando em uma cascata de eventos promovendo a proliferação celular (PORTER, 2005).

A energia fóton é transmitida para os tecidos em forma de energia eletromagnética e cria uma série de efeitos biológicos estimuladores ou inibitórios (KANEPS et al., 1983).

O laser é absorvido provavelmente por meio de receptores primários e secundários. Os cromóforos naturais como o pigmento heme; o pigmento citocromo da cadeia respiratória na mitocôndria e o pigmento melanina são considerados receptores primários. Já os secundários são estruturas que absorvem energia que atinge os tecidos por intermédio dos campos eletromagnéticos causando uma ressonância com as biomoléculas, alterando cargas específicas nas membranas e nas proteínas de superfície (LAM, 1984).

O laser possui efeito distinto, de acordo com a interação com a matéria. Estes efeitos podem ser classificados como: 1) bioquímicos, nos quais o laser provoca a liberação de substâncias pré-formadas como a histamina, a serotonina e a bradicinina, bem como induz modificações nas reações enzimáticas normais, acelerando ou retardando essas reações; 2) bioelétricos, nos quais a radiação laser proporciona aumento na produção de ATP, o que promove aumento da eficiência da bomba de sódio-potássio e com isso a diferença de potencial elétrico existente entre o interior e o exterior da célula é mantido com melhores



resultados; e 3) bioenergéticos, nos quais o laser tem a capacidade de normalizar o contingente energético físico dos indivíduos (ROCHA, 2004).

Ozdemir et al. (2001) buscaram avaliar a eficácia analgésica e as mudanças funcionais resultantes da terapia laser em casos de osteoartrite cervical em pacientes humanos. Dor e resultados físicos foram relacionados, como espasmo do músculo paravertebral aumentado e movimento de pescoço. Foi observado melhora significativamente no grupo tratado com laser.

A curta duração do tratamento com a terapia laser oferece uma ação antiinflamatória não farmacológica. A efetividade da terapia laser depende da própria seleção do comprimento de onda, da produção de energia, da duração do tratamento e da frequência do tratamento de acordo com a condição do paciente (PORTER, 2005).

Nem todos os mecanismos de interação biológica são conhecidos, sendo cada tipo celular afetado de maneira diferente, dependendo do comprimento de onda de energia do fóton. Por esta razão fica difícil extrapolar os efeitos de um tipo celular para os demais (CORRAL-BAQUES et al., 2005).

Um estudo feito com espermatozóides de cães avaliou o efeito do comprimento de onda de 655-nm de radiação com laser diodo sobre a motilidade espermática. Neste estudo, Corral-Baques et al. (2005) relataram aumento significativo na motilidade espermática, 15 a 45 minutos após a irradiação dos espermatozóides. Além do aumento de motilidade, os autores relataram queda na produção de l-lactato no grupo irradiado em comparação ao grupo controle, o que demonstra mudança no metabolismo aeróbico para a produção de energia.

Iaffaldano et al. (2005) utilizaram a irradiação de laser He-Ne (hélio-neon) em espermatozóides de peru com intuito de melhorar a motilidade após o período de estocagem. Observaram aumento na motilidade e na qualidade do sêmen, sendo esta mantida por um período de até 60 horas de estocagem após a aplicação da radiação.

A membrana plasmática do espermatozóide regula a concentração de cálcio intracelular, principalmente pela bomba de cálcio ATP-dependente, bomba sódio/cálcio e pelo canal de cálcio voltagem dependente. Lubart et al. (1992) estudaram mudanças no transporte de cálcio em espermatozóides congelados de bovinos irradiados com 780 nm de laser diodo em diferentes dosagens e potências de energia, pós-descongelamento. Observaram que 780 nm de irradiação de laser diodo inibem a captação de cálcio pela mitocôndria, no entanto, estimulam o cálcio a se ligar nas vesículas da membrana plasmática do espermatozóide, promovendo melhor manutenção celular.



Foi estudado o efeito da luz no transporte de cálcio em mitocôndrias e na membrana plasmática de espermatozóide congelado de bovinos. Os espermatozoides foram descongelados e irradiados com laser HeNe com diferentes potências e dosagens de energia. A membrana plasmática foi tratada com Digitonine (substância usada para solubilizar lipídeos e precipitar colesterol) e a captação de cálcio foi medida pelo método de filtração celular (filtro GF/C). Os autores relataram aumento da captação de cálcio pela mitocôndria ( $P < 0,01$ ) quando os espermatozoides foram tratados com baixa irradiação de HeNe (0,3 mW de potência, com 633nm de comprimento de onda com doses de energia entre 0,06 e 0,2 J/cm<sup>2</sup>). No entanto, com potência elevada de 10 mW de laser HeNe e com dose de energia entre 0,6 e 7,2 J/cm<sup>2</sup> ocorreu inibição na captação de cálcio. O fluxo de cálcio pela mitocôndria também foi examinado, no entanto não foi afetado pela luz HeNe (BREITBART et al., 1996).

Os resultados do trabalho de Breitbart et al. (1996) indicam que a membrana plasmática (sem porfirinas, substância cromófora que reage a luz fóton) não é afetada pela irradiação de HeNe nas intensidades supracitadas. Isto sugere que o transporte de cálcio nas células irradiadas com 633nm é determinado pela capacidade e quantidade de cálcio captado pelas mitocôndrias. Mitocôndrias isoladas de vários tecidos têm a capacidade de acumular grandes quantidades de cálcio no compartimento de matriz intracelular. A regulação da concentração de cálcio intracelular é importante no controle da motilidade e reação acrossômica de espermatozóide, bem como na mitose em células somáticas (BREITBART et al., 1996).

O uso de 1,48 µm de comprimento de onda de laser diodo foi desenvolvido como um método alternativo de imobilização de espermatozóide para utilização em ICSI. Espermatozoides humanos têm sido imobilizados com esta técnica obtendo resultados satisfatórios em termos de fecundação, desenvolvimento embrionário e formação de blastocisto *in vitro*. O espermatozóide recebe duas irradiações de laser sucessivas, sendo a primeira no meio da cauda (15 ms; 1,5 mJ) e a segunda diretamente no término da cauda (10 ms; 1,0 mJ). O espermatozóide imobilizado é cuidadosamente injetado no eixo horizontal do oócito. Quatro semanas após a transferência do embrião, com auxílio de ultra-som transvaginal foi observada a presença do saco gestacional com atividade cardíaca. A gestação veio a termo com 38 semanas (EBNER et al., 2002).

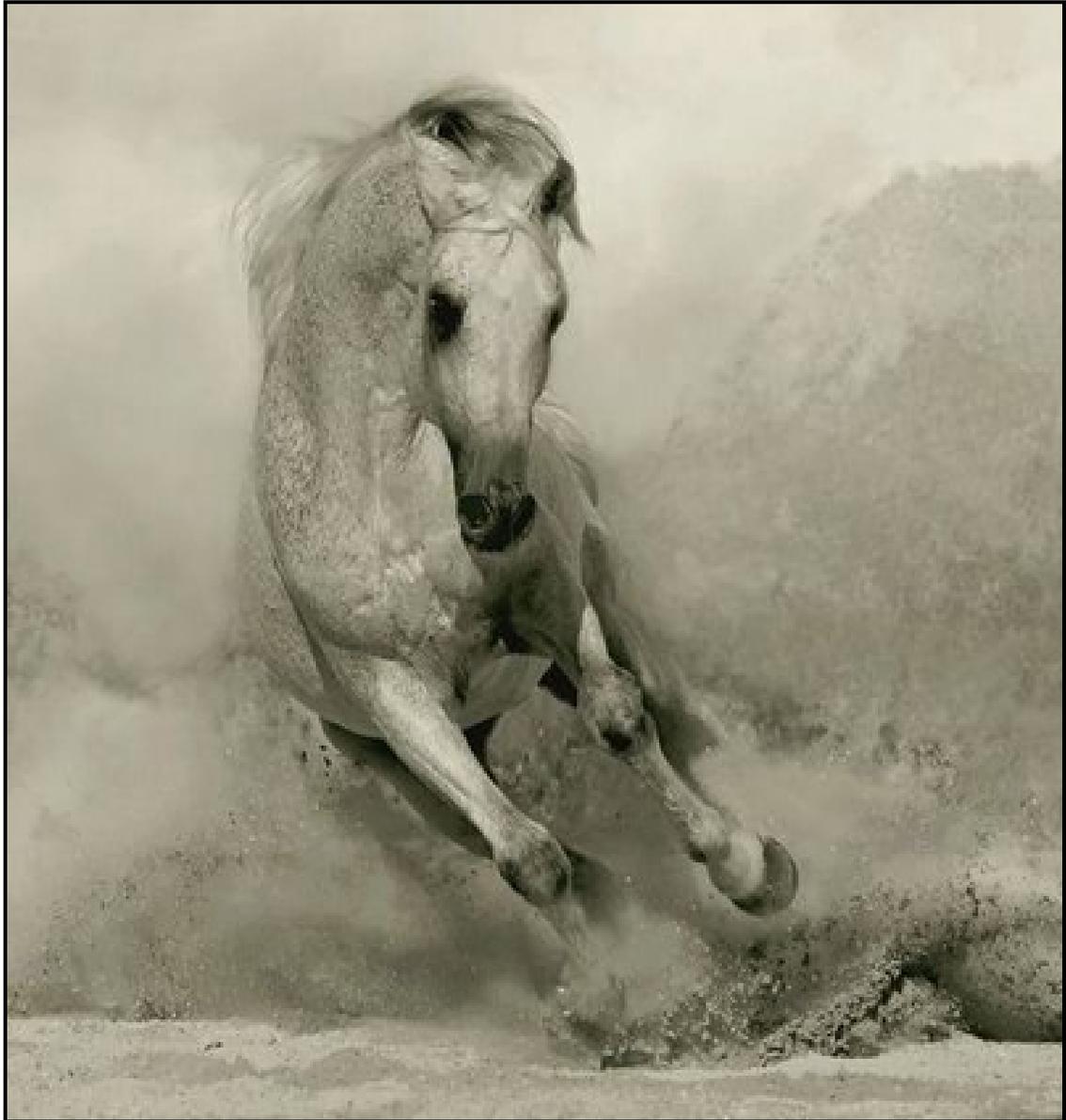
A terapia laser de baixa intensidade (LLLT) foi analisada nas propriedades e força do osso femoral de ratas após ovariectomia. A osteoporose afeta 30% das mulheres pós menopausa e foi reconhecida como um problema de saúde pública. Baseado nos efeitos



estimulatórios da LLLT e na proliferação de células ósseas, esta terapia foi eficiente na prevenção de perda de massa óssea em ratos ovariectomizados. Foi utilizado o laser de gallium-aluminum-arsenate (GaAIAs) com 830 nm de comprimento de onda na dose de 120 J/cm<sup>2</sup>. Os resultados deste estudo indicaram que a LLLT foi capaz de prevenir perda óssea em ratas depois da ovariectomia (RENNO et al., 2006).

Uma pesquisa retrospectiva foi realizada para testar a efetividade do laser cloreto de xenônio com 308nm de comprimento de onda no tratamento de vitiligo e determinar fatores que favorecem uma boa resposta na pigmentação. Dos 221 pontos de vitiligo tratados dos 97 pacientes, 50,6% mostraram 75% de pigmentação, 25,5% alcançaram 100% de pigmentação dos pontos e 64,3% mostraram 50% de pigmentação. Lesões na face responderam melhor do que as lesões em outra parte do corpo. Os autores concluíram que o laser cloreto de xenônio com 308-nm de comprimento de onda é uma modalidade efetiva e segura para o tratamento de vitiligo, com bons resultados alcançados em um curto espaço de tempo (HADI et al., 2006).





## *5 Material e Métodos*

---

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 LOCAL

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia do Centro de Biotecnologia em Reprodução animal (CBRA) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), localizado no Campus de Pirassununga. O período experimental estendeu-se de abril a julho de 2007.

### 5.2 ANIMAIS

Foram utilizados cinco garanhões, com idade entre 4 e 17 anos, alojados em baias individuais e soltos em piquetes três vezes por semana, nas dependências do setor de Equideocultura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS), no Estado de São Paulo. Os animais foram mantidos sob as mesmas condições de manejo nutricional, sendo alimentados com feno, capim, concentrado, sal mineral e água a vontade.

### 5.3 COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN

Foram realizadas cinco colheitas de sêmen de cada garanhão (n=25). Antes das colheitas foi realizada a higienização do pênis do animal com algodão e água morna a 33°. As colheitas de sêmen foram realizadas com vagina artificial, modelo Missouri, com auxílio de égua-manequim em estro, devidamente contida.

Após a colheita, o sêmen foi imediatamente enviado ao laboratório, onde foi realizada filtragem para separação da fração gelatinosa, mensuração do volume do ejaculado sem o gel (mL), concentração espermática ( $\times 10^6$  spz/mL), análise computadorizada do movimento



espermático, análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial.

#### 5.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental seguiu os procedimentos apresentados na figura 1 e na figura 2.

As amostras *in natura* foram divididas em dois grupos: LASER – espermatozóides frescos diluídos e tratados com laser e SEM LASER – espermatozóides frescos diluídos não tratados. Após as avaliações, amostras de ambos os grupos (LASER e SEM LASER) foram congeladas. Após a descongelação foram formados três grupos experimentais: 1) LASER ANTES - espermatozóides criopreservados do grupo LASER (Parte A); 2) SEM LASER - espermatozóides criopreservados do grupo SEM LASER (Parte B) e 3) LASER DEPOIS - espermatozóides tratados com laser após a descongelação do grupo SEM LASER (Parte C). As amostras descongeladas foram avaliadas no tempo zero (imediatamente após a descongelação) e no tempo 2 (duas horas após a descongelação), sendo mantidas incubadas em banho-maria durante este período (Partes A, B e C).



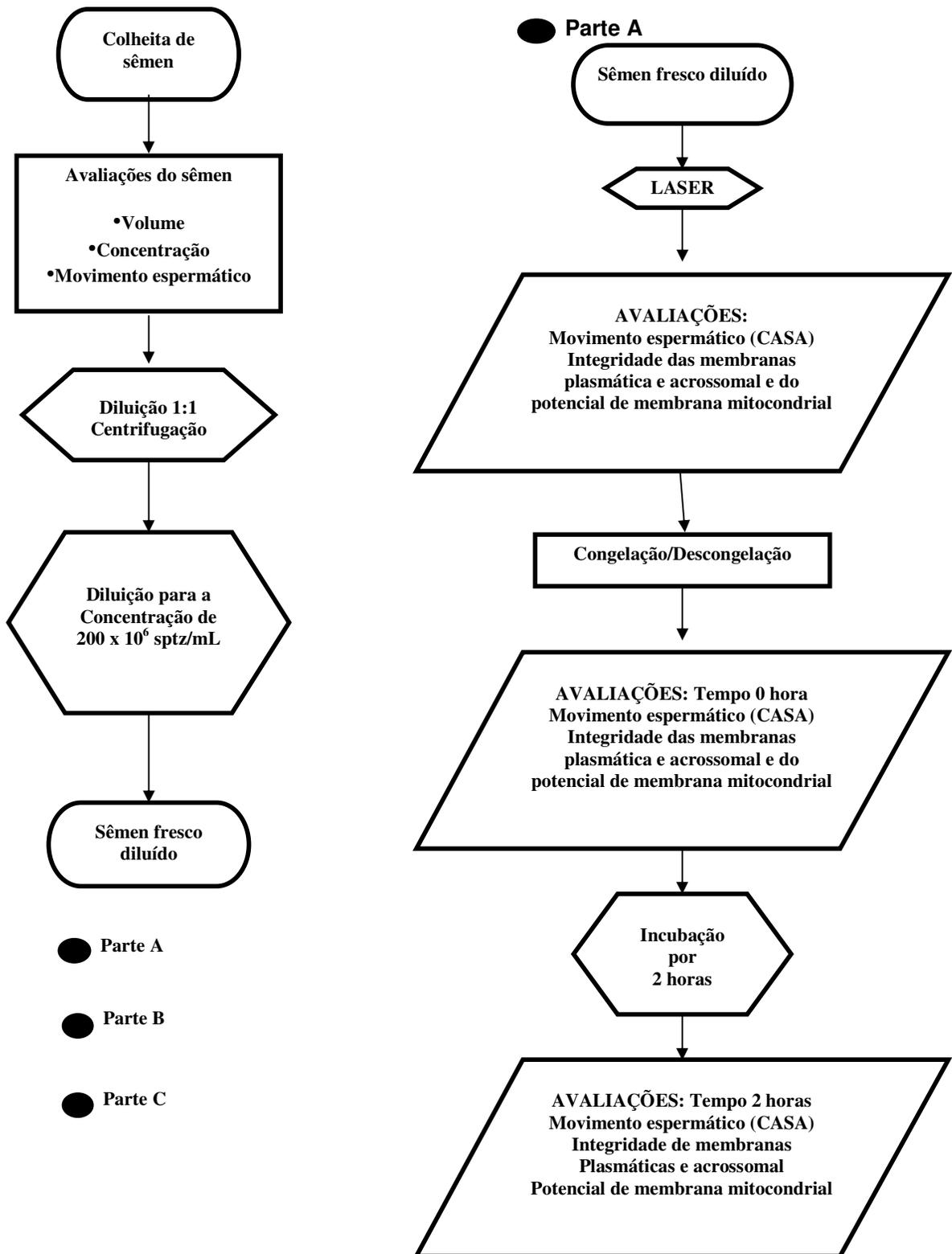


Figura 1-Fluxograma do delineamento experimental



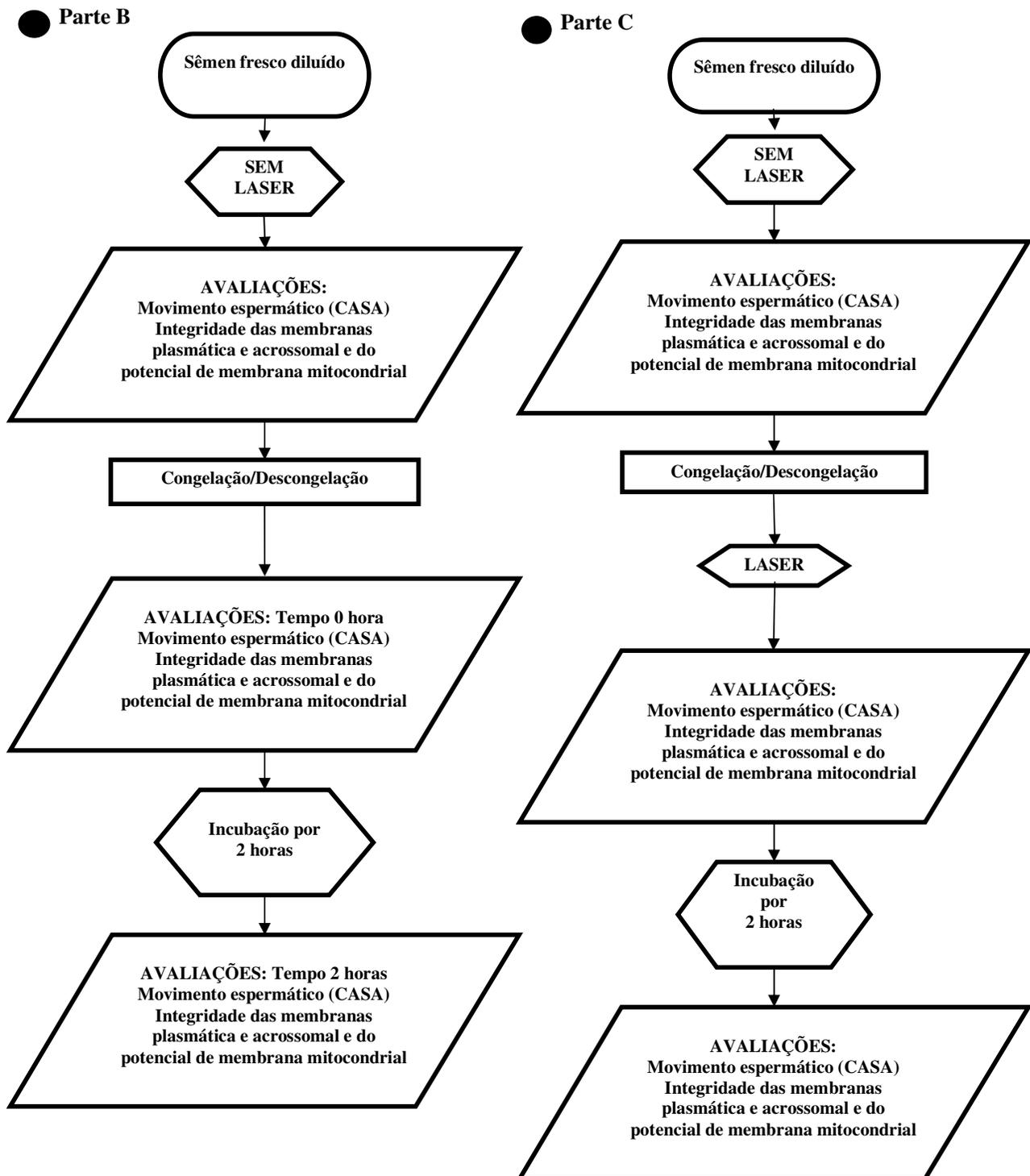


Figura 2-Fluxograma do delineamento experimental



## 5.5 AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DAS CARACTERÍSTICAS DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO (Computer Assisted Semen Analysis - CASA)

Para a avaliação da motilidade espermática utilizou-se o aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (HTM-IVOS, Version 10.8, Hamilton Thorne Research Motility Analyser, Beverly, MA, USA) e o sistema computadorizado (CASA), no qual a amostra de sêmen foi diluída em Botu-Crio<sup>®</sup> sem crioprotetor (Biotech Ltda/ME, Botucatu, SP, Brasil) na concentração de  $25 \times 10^6$  espermatozóides/mL. Dois microlitros desta solução foram colocados na câmara de leitura (2X Cell), previamente aquecida, A captura da imagem foi feita por um microscópio acoplado a um computador, sendo depois digitalizada para ser analisada pelo *software*. Para isto, cada célula espermática foi identificada e a trajetória reconstruída (VERSTEGEN et al., 2002), sendo previamente ajustado (*setup*) para a análise de sêmen equino (Anexo A). Um mínimo de 10 campos foi selecionado manualmente para a leitura e análise, buscando sempre os de melhor visualização.

As características analisadas foram: células rápidas, motilidade total (MT - %), motilidade progressiva (MPRO - %), velocidade de trajeto (VAP -  $\mu\text{m/s}$ ) definido pela distância total do trajeto de cada célula dividido pelo tempo decorrido, velocidade progressiva (VSL -  $\mu\text{m/s}$ ) é a distância da linha percorrida entre o início e o fim do trajeto dividido pelo tempo decorrido, velocidade curvilinear (VCL -  $\mu\text{m/s}$ ), deslocamento lateral da cabeça (ALH -  $\mu\text{m}$ ) corresponde à média da largura da cabeça e a oscilação de sua movimentação, frequência de batimento flagelar (BCF - Hz) é a frequência em que o espermatozóide atravessa seu percurso em cada direção, retilinearidade (STR - %) mensura o caminho retilíneo da célula, é a razão entre VSL/VAP e linearidade (LIN - %) corresponde à direção do trajeto, é a razão entre VSL/VCL, cujas definições foram descritas por Kathiravam et al. (2008).



## 5.6 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL E POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL PELA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO

### 5.6.1 Análises das amostras pela citometria de fluxo

Uma alíquota de 1mL foi retirada de cada tratamento e adicionada a 1mL de solução de TALP *sperm* (BAVISTER et al., 1983) (Anexo B). Estas alíquotas foram centrifugadas a 300g por 10 minutos (Minicentrífuga Modelo Mini Spin Plus, Eppendorf) em tubos de microcentrífuga (1,5 mL) e mantidas pré-aquecidas a 37 °C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado com 900µL de TALP com PVA (Álcool Polivinílico - IMV) (Anexo C). Deste modo, as amostras apresentavam a concentração de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Em seguida, duas alíquotas de 150µL desta amostra foram acondicionadas em tubo cônico de 1,5mL, sendo acrescido as sondas fluorescentes. Um tubo recebeu 80µL de FITC-PSA + 3µL de PI para análise das membranas plasmática e acrossomal, e outro recebeu 6µL de JC-1 para análise do potencial de mitocôndria (Anexo D). Após 8 minutos de incubação em temperatura ambiente e protegidos da luz, as amostras foram re-diluídas com a adição de 600 µL de TALP sem BSA e transferidas para tubos tipo Falcon graduados até 15 mL (37 °C). Com isso, as amostras apresentaram uma concentração de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL no momento de serem analisadas pela técnica de citometria de fluxo.

As amostras foram tratadas com o *laser* de argônio (Modelo Sapphire 488-20, Coherent®) e os filtros C (*Long Pass* 595nm/ *Band Pass* 610/20nm), D (*LP* 556nm/ *BP* 575/26nm) e E (*LP* 502nm/ *BP* 530/30nm). Todas as amostras tiveram 10.000 células analisadas.

O gráfico 1 apresenta o histograma das subpopulações encontradas, após a leitura pela técnica de citometria de fluxo. No quadrante superior esquerdo (PLAI) estão representados a subpopulação de espermatozoides que apresentam membrana plasmática lesada e acrossoma íntegro, no quadrante superior direito (PLAL) a subpopulação de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesadas, no quadrante inferior esquerdo (PIAI) estão a subpopulação de espermatozoides com membrana plasmática e acrossoma íntegro e no



quadrante inferior direito (PIAL) a subpopulação de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossoma lesado.

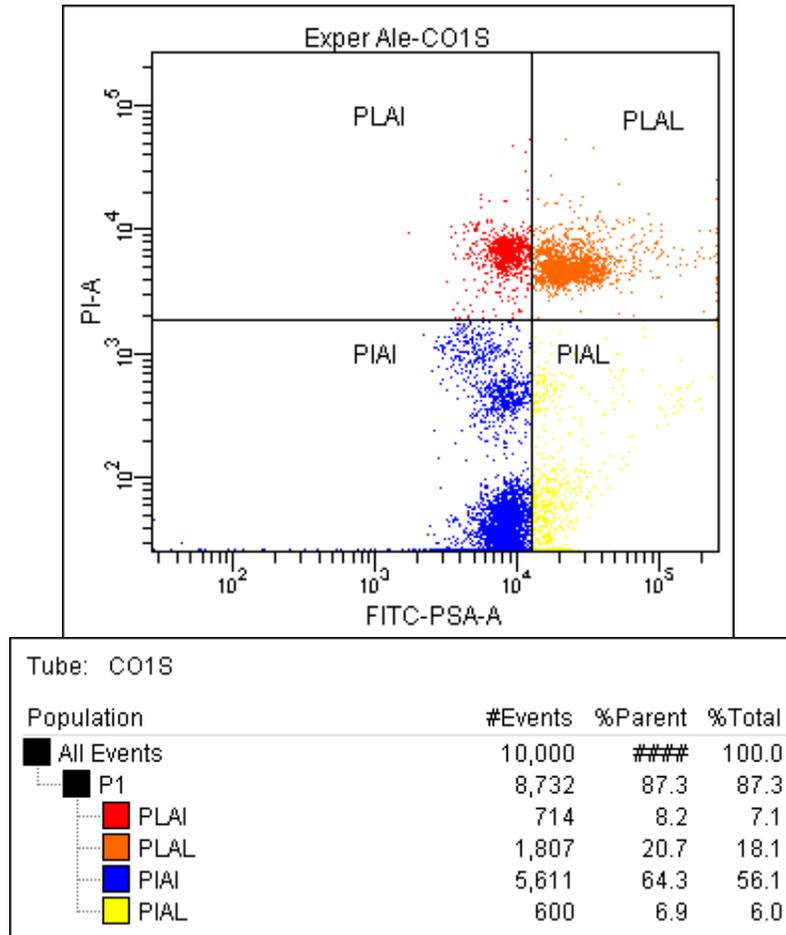


Gráfico 1-Histograma “dot plots” dos resultados da análise, pela citometria de fluxo, das membranas plasmática e acrossomal (subpopulações), em amostra de sêmen *in natura*, no grupo SEM LASER (Pirassununga-2007)

No gráfico 2 está representado as subpopulações de espermatozoides com alto ou baixo potencial de membrana mitocondrial evidenciado pela sonda fluorescente JC-1. No quadrante superior (JC-1 agregados) estão as subpopulações de espermatozoides com alto e médio potencial de membrana mitocondrial com seus valores agregados e no quadrante inferior (JC-1 monômeros) estão as subpopulações de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial.



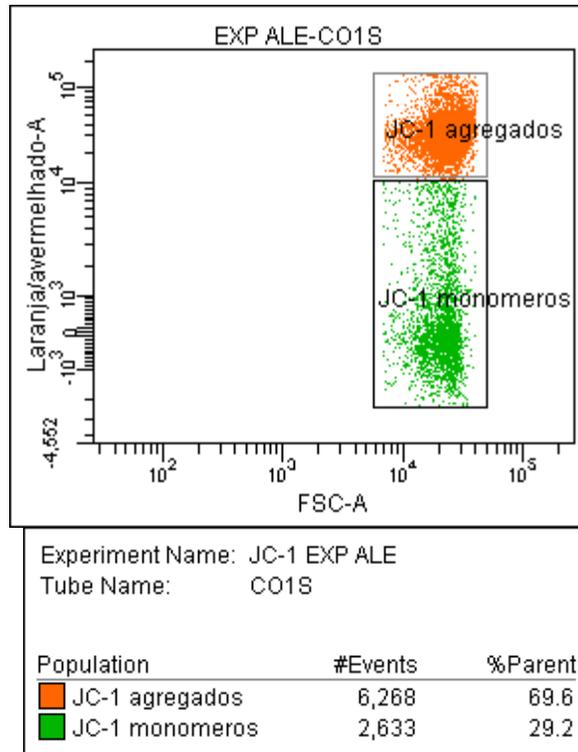


Gráfico 2-Histograma “dot plots” dos resultados da análise do potencial de membrana mitocondrial (subpopulações) pela citometria de fluxo, em amostra de sêmen *in natura*, no grupo SEM LASER (Pirassununga-2007)

## 5.7 PREPARAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

### 5.7.1 Centrifugação

Após a colheita, o sêmen foi diluído utilizando o diluidor a base de leite (Botu-Sêmen® - Biotech Ltda/ME, Botucatu, SP, Brasil), aquecido a 37 °C, na proporção 1:1. Em seguida, este volume foi distribuído em tubos para centrifuga graduados até 15 mL (37 °C) e centrifugado a 350g/10min (Centrífuga de Bancada Excelsa II, Modelo 206 BL, Fanem®), para a sedimentação celular. O sobrenadante foi retirado e ao sedimento resultante adicionado 200 µL do diluidor Botu-Crio® (Biotech Ltda/ME, Botucatu, SP, Brasil) para a manutenção das células durante o cálculo da concentração espermática.



### 5.7.2 Concentração espermática

A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer, sendo uma amostra de 20  $\mu\text{L}$  retirada do sedimento após a centrifugação e diluída em 200  $\mu\text{L}$  do diluidor (diluição 1:100).

### 5.7.3 Ressuspensão do sedimento espermático

Após avaliação da concentração espermática, realizou-se a diluição do sedimento em diluidor Botu-Crio<sup>®</sup> (Biotech Ltda/ME, Botucatu, SP, Brasil) para a concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

### 5.7.4 Envase do sêmen

A amostra diluída foi envasada em palhetas francesas de 0,5 mL, previamente identificadas com o nome do garanhão, a partida do ejaculado, a concentração espermática final e o grupo experimental, as quais foram cuidadosamente lacradas com álcool polivinílico em pó.

### 5.7.5 Criopreservação do sêmen

O sêmen foi criopreservado utilizando o sistema de criopreservação portátil (TK 3000<sup>®</sup>, TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, MG, Brasil), composto por um aparelho programável, equipado com um porta-palhetas, um tubo de resfriamento e uma caixa térmica para nitrogênio líquido.

Para o resfriamento, as palhetas foram colocadas no local apropriado (porta-palhetas), permanecendo neste até alcançar 5°C, obedecendo à velocidade de resfriamento de -0,25°C/minuto, com duração aproximada de 1 hora e 15 minutos. Ao atingir 5°C, o recipiente



foi transferido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido, local no qual a velocidade de congelação foi de  $-20^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  de  $5^{\circ}\text{C}$  até  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após atingir esta temperatura, a velocidade passou a ser de  $-10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  até  $-120^{\circ}\text{C}$ . Neste momento, as palhetas foram removidas e imersas em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). As palhetas foram colocadas cuidadosamente em raques identificadas com o nome do garanhão e data da colheita, sendo padronizada a localização das palhetas com laser nos *gobellets* superiores e as palhetas sem laser nos *gobellets* inferiores. Por fim, as raques foram armazenadas em botijões criogênicos.

## 5.8 DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN

Duas palhetas de sêmen de cada tratamento e garanhão, de uma mesma partida foram descongeladas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e o sêmen colocado em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, pré - aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$ . Foram retiradas alíquotas para análise pós-descongelação, sendo o restante mantido nos tubos para microcentrífuga em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  durante duas horas até a próxima avaliação.

## 5.9 LASER E PROCEDIMENTO DE IRRADIAÇÃO

### 5.9.1 Pré-experimento

No período de pré-experimento foram testadas diferentes dosagens de irradiação de energia laser expressa em  $\text{Joules}/\text{cm}^2$ . Foram testadas as doses de 4, 6 e  $10 \text{ J}/\text{cm}^2$ , durante 100, 120 e 150 segundos, respectivamente. Em condições escuras, as amostras foram distribuídas em placas de Petri de 30 mm, contendo 2 mL de sêmen cada uma. A fibra ótica contendo o laser foi posicionada logo acima da placa e então iniciada a irradiação. A mesma manipulação foi realizada com as amostras controle (sem laser). Imediatamente após a irradiação, uma lâmina foi confeccionada e analisada no aparelho Hamilton Thorne Research Motility



Analyser (CASA). As amostras utilizadas nesta fase foram de sêmen fresco e congelado. De acordo com as médias das motilidades, optou-se pela dosagem de  $6 \text{ J/cm}^2$  por 120 segundos.

### 5.9.2 Experimento

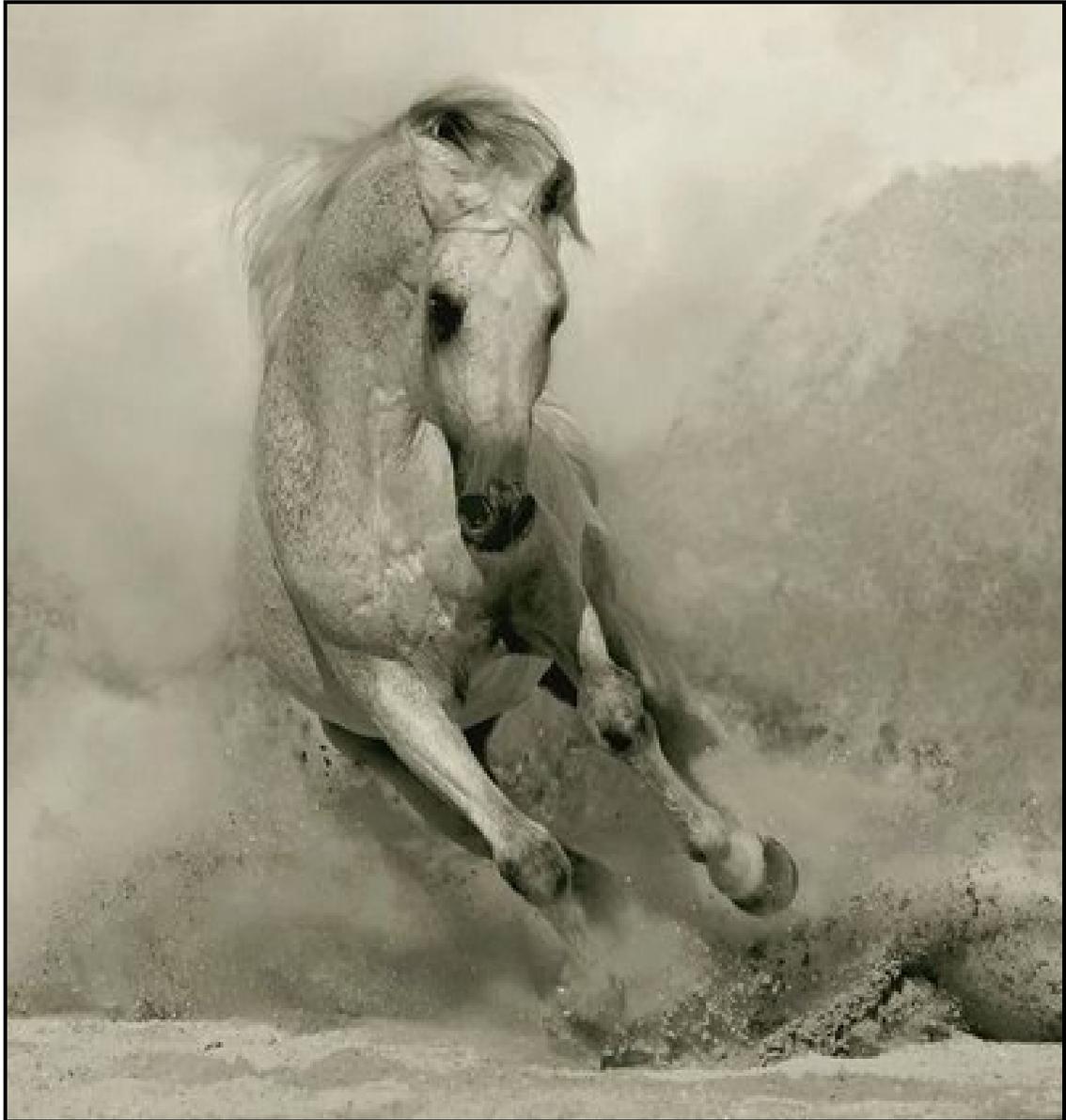
O equipamento utilizado para as irradiações laser foi o sistema INOVA projetado e desenvolvido pela **LASERLine Indústria e Comércio de Equipamentos Eletrônicos Ltda.** A fonte de luz foi de 650nm de comprimento de onda de laser diodo, com potência média de 50mW. A dose de irradiação contínua foi de  $6 \text{ J/cm}^2$ , durante 120 segundos. Em condições escuras, as amostras foram distribuídas em placas de Petri de 30 mm contendo 2ml de sêmen. A fibra óptica foi acondicionada acima da placa abrangendo toda a amostra.

### 5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi delineado em blocos generalizados, sendo que cada garanhão foi considerado como um bloco. Foi utilizado o complemento de delineamento medidas repetidas no tempo no caso das amostras pós-descongelamento. Os dados foram analisados empregando-se o programa *Statistical Analysis System 9.1* (SAS, 2003). Primeiramente foi verificada a normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Hartley. Os valores que não respeitaram as premissas foram transformados em arco-seno.

Os dados gerados pelas amostras avaliadas previamente às congelações foram somente analisados pela Análise de Variância (PROC ANOVA). Já os dados do sêmen pós-descongelamento tiveram adicionado à análise estatística o fator medidas repetidas no tempo, referentes aos dois momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM). Como teste complementar para comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey. As hipóteses testadas foram consideradas significativas em 5 %.





## *6 Resultados e Discussão*

---

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados apresentados foram seqüenciados de acordo com o delineamento experimental, com consecutiva discussão dos resultados de cada etapa. As avaliações espermáticas, pela técnica de citometria de fluxo, como a integridade das membranas plasmática e acrossomal foram realizadas simultaneamente, e as de potencial de membrana mitocondrial isoladamente.

As primeiras avaliações correspondem ao sêmen *in natura*, após análise computadorizada do movimento espermático (CASA) demonstrado na tabela 1. A avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, pela citometria de fluxo, esta demonstrado na tabela 2.

Nas tabelas 3 a 6 estão descritos os resultados das avaliações correspondentes ao sêmen congelado, pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial, pela citometria de fluxo, no momento da descongelação (T0) e após duas horas de incubação (T2).

### 6.1 ANÁLISE DO SÊMEN FRESCO

A motilidade espermática é um fator crucial para a fecundação do oócito, sendo regulada com base nos diferentes requerimentos para os tipos de movimento, dependendo de sua localização no trato feminino e sua proximidade com o oócito. A cauda do espermatozóide confere a motilidade à célula. É uma estrutura complexa que reflete adaptabilidade às rápidas mudanças de características funcionais (EDDY; O'BRIEN, 1994).

Na tabela 1, uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) nos resultados da frequência de batimento flagelar foi evidenciada. O grupo que recebeu o tratamento com LASER apresentou melhor frequência de batimento flagelar em relação ao grupo não tratado. Quanto à retilinearidade, embora sem diferença significativa, pode-se observar uma motilidade aparentemente mais retilínea do que no grupo sem LASER.



Tabela 1-Médias ( $\pm$  erros padrão) dos tipos de movimento espermático avaliados pelo CASA, nas amostras *in natura* diluídas, nos tratamentos LASER e SEM LASER (Pirassununga-2007)

<b>Características</b>	<b>LASER</b>	<b>SEM LASER</b>	<b>P</b>
<b>CÉLS RÁPIDAS</b>	64,76 $\pm$ 4,92	65,16 $\pm$ 4,83	0,8355
<b>MT</b>	68,32 $\pm$ 4,59	69,20 $\pm$ 4,48	0,6952
<b>MPRO</b>	40,96 $\pm$ 3,88	38,60 $\pm$ 3,85	0,2343
<b>VAP</b>	102,01 $\pm$ 5,54	106,53 $\pm$ 5,91	0,1252
<b>VSL</b>	81,52 $\pm$ 4,47	83,43 $\pm$ 4,56	0,3782
<b>VCL</b>	178,54 $\pm$ 9,12	180,45 $\pm$ 9,44	0,4407
<b>ALH</b>	5,83 $\pm$ 0,21	5,80 $\pm$ 0,22	0,9299
<b>BCF</b>	34,88 $\pm$ 0,79	33,42 $\pm$ 0,84	0,0121
<b>STR</b>	80,48 $\pm$ 1,09	79,24 $\pm$ 1,26	0,0691
<b>LIN</b>	48,96 $\pm$ 2,23	48,84 $\pm$ 2,27	0,8962

MT – motilidade total; MPRO - motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL - velocidade progressiva; VCL - velocidade curvilínea; ALH – amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF – frequência de batimento flagelar; STR – retilinearidade; LIN – linearidade.

Estes dados indicam uma adaptação da célula ao ambiente, após exposição à radiação laser (grupo LASER). Os resultados significativos da frequência do batimento flagelar (BCF) e retilinearidade sugerem um melhor aproveitamento da energia produzida pela célula. Ainda que não fosse observada uma diferença na motilidade total e motilidade progressiva, o aumento na frequência do batimento flagelar indica que a célula é sensível à energia fóton, podendo ser estimulada com resposta positiva em relação à motilidade.

Dados suportam a hipótese que qualquer mamífero possui na constituição do ejaculado populações heterogêneas de espermatozoides que diferem entre si funcionalmente. Estas subpopulações dentro do trato feminino são selecionadas por múltiplos fatores intrínsecos, o que reduz a população espermática em milhões de células, restando poucos e competentes espermatozoides para a fecundação (HOLT; VAN LOOK, 2004).



Um estudo feito por Muiño et al. (2007), determinaram a existência de quatro subpopulações espermáticas com características de motilidade específica em sêmen fresco de touros Holandeses. A subpopulação 1 foi representada por espermatozóides com baixa velocidade (baixos valores de VCL, VSL e VAP) mas com alta progressividade (altos valores de LIN, STR, BCF e baixo ALH). A subpopulação 2, os espermatozóides ativos mas não progressivos (alto valor de VCL e ALH, baixo valor de LIN e STR e moderado BCF) chamados hiperativados. A população 3 incluíram os espermatozóides de baixa motilidade e não progressivos (todos os valores baixos de VCL, VSL, VAP, ALH, BCF, LIN e STR). A subpopulação 4 foi representada pelos espermatozóides mais rápidos e mais progressivos (altos valores de VCL, VSL, VAP, BCF, LIN, STR e moderado ALH).

Os valores encontrados neste presente trabalho definem uma população de espermatozóides ativos e moderadamente progressivos, ainda que com altos valores de STR. Ambos os grupos (LASER e SEM LASER) apresentaram o mesmo comportamento. Considerando que os valores de BCF foram maiores e significativos no grupo com LASER, essas células foram capazes de tornar os movimentos mais progressivos. O baixo valor de ALH mostra que as células mantiveram um limiar retilíneo durante seu trajeto. Mesmo não tendo diferença significativa em relação à motilidade, os dados mostram uma ativação do movimento espermático positiva, não apresentando ainda uma hiperativação, visto que os dados da análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal (tabela 2) não apresentaram diferença significativa entre os grupos LASER e SEM LASER.

Corral et al. (2005) relataram aumento na motilidade total em espermatozóides de cães após irradiação de 655 nm contínua de laser diodo em doses de energia de 4, 6 e 10 J/cm<sup>2</sup> com potência média do raio de 21,7 mW. Os autores relatam aumento da BCF nos grupos tratados com laser em relação ao grupo controle.

No presente estudo, embora sem diferença significativa, a motilidade parece ser estimulada após o tratamento com o laser. A potência média do raio de 50mW, na dose de 6J/cm<sup>2</sup> durante 120s, pode ser a explicação de não ter havido diferença significativa. Se a dose, tempo e potência da irradiação laser fossem adequadas para espermatozóides de equinos, talvez uma melhora na motilidade fosse detectada como descrito por Corral et al. (2005).



Tabela 2 - Médias ( $\pm$  erros padrão) dos espermatozoides avaliados pela citometria de fluxo das características das membranas plasmática e acrossomal (PIAI) e do alto potencial de membrana mitocondrial (APM), nas amostras *in natura* diluídas, nos grupos LASER e SEM LASER (Pirassununga-2007)

Características	LASER	SEM LASER	P
PIAI	55,73 $\pm$ 1,78	57,17 $\pm$ 1,80	0,4323
APM	71,17 $\pm$ 1,52	70,17 $\pm$ 1,33	0,4079

Observando a tabela 2, não houve nenhuma diferença significativa entre os tratamentos LASER e SEM LASER, tanto para a integridade das membranas plasmática e acrossomal, bem como para o potencial de membrana mitocondrial.

A regulação do cálcio intracelular possui um papel vital na proliferação celular e em células espermáticas tem a função de controlar a motilidade espermática e a reação acrossomal. Alterações nos níveis de cálcio intracelular em resposta à exposição à luz, podem ser consideradas um evento biológico e clínico (BREITBART et al., 1996). Tal afirmação se deve ao fato de que o sistema que regula a concentração de cálcio intracelular no espermatozoide envolve a mitocôndria e a membrana plasmática (LEHNINGER, 1970). Cromóforos presentes na mitocôndria podem absorver diferentes comprimentos de onda de luz fóton, sugerindo uma mudança na atividade desta organela, mas como isso acontece ainda é bastante discutido (BREITBART et al., 1996). No presente estudo, ao ser aplicado o laser no sêmen *in natura* não houve alterações detectadas na membrana mitocondrial, podendo ser justificado pelo comprimento de onda utilizado, que pode não ter sido suficiente para alterar o metabolismo espermático nesta espécie.

## 6.2 ANÁLISE DO SÊMEN CONGELADO

O processo de criopreservação tem efeito negativo e significativo sobre as características espermáticas e a frequência de distribuição das subpopulações heterogêneas que compõe o sêmen. Diferentes taxas de mortalidade espermática causadas pelo processo de



criopreservação mudam essa frequência e modificam o status de motilidade e sobrevivência da célula (HOLT; VAN LOOK, 2004).

Tabela 3 - Médias ( $\pm$  erros padrão) das avaliações espermáticas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), nas amostras descongeladas no T0 com os tratamentos LASER ANTES (da congelção), LASER DEPOIS (da descongelção) e SEM LASER (Pirassununga-2007)

<b>Características</b>	<b>LASER ANTES</b>	<b>LASER DEPOIS</b>	<b>SEM LASER</b>
<b>CÉLS RÁPIDAS</b>	39,48 $\pm$ 4,41	36,68 $\pm$ 3,84	38,04 $\pm$ 4,13
<b>MT</b>	42,28 $\pm$ 4,36	38,80 $\pm$ 3,76	40,52 $\pm$ 4,25
<b>MPRO</b>	31,16 $\pm$ 3,18	29,32 $\pm$ 2,90	29,60 $\pm$ 2,97
<b>VAP</b>	87,32 $\pm$ 4,79	88,54 $\pm$ 4,66	87,52 $\pm$ 4,70
<b>VSL</b>	75,71 $\pm$ 4,13	76,87 $\pm$ 3,92	75,66 $\pm$ 3,88
<b>VCL</b>	151,17 $\pm$ 7,79	154,35 $\pm$ 8,15	153,24 $\pm$ 8,28
<b>ALH</b>	5,24 $\pm$ 0,19	5,28 $\pm$ 0,22	5,26 $\pm$ 0,19
<b>BCF</b>	35,22 $\pm$ 0,98	36,64 $\pm$ 0,63	35,32 $\pm$ 0,95
<b>STR</b>	86,56 $\pm$ 0,80	86,93 $\pm$ 0,71	86,44 $\pm$ 0,79
<b>LIN</b>	52,64 $\pm$ 1,29	52,28 $\pm$ 1,37	51,76 $\pm$ 1,28

MT – motilidade total; MPRO - motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL - velocidade progressiva; VCL - velocidade curvilínea; ALH – amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF – frequência de batimento flagelar; STR – retilinearidade; LIN – linearidade.  $P > 0,05$ .

Não houve diferença significativa entre as características avaliadas em nenhum dos grupos testados. O que pode ser observado é que existe uma diferença numérica no tratamento com LASER ANTES da congelção para as variáveis células rápidas, motilidade total e motilidade progressiva.

Iaffaldano et al. (2005) avaliaram os efeitos da irradiação do laser He-Ne em diferentes doses de energia com potência de 6 mW na qualidade do sêmen estocado de Peru. Observaram que a dose de energia de 3,96 J/cm<sup>2</sup> aumentava os índices de motilidade e viabilidade do sêmen estocado por 60h comparado com o controle ( $P < 0,05$ ). O presente



estudo corrobora com os relatos de Iaffaldano et al. (2005) em relação à preservação da célula espermática durante a estocagem.

Analisando os dados numéricos e classificando as subpopulações de acordo com Muiño et al. (2007), após a descongelação, neste presente estudo, ficou evidenciado uma população rápida, mas moderadamente progressiva entre os grupos, não diferindo significativamente. Ao comparar os dados do sêmen *in natura* com o descongelado, apesar da não diferença significativa foi observado a perda da progressividade com o processo de criopreservação. Os dados de STR e LIN nos grupos LASER ANTES e SEM LASER dos espermatozoides descongelados foram maiores do que os espermatozoides *in natura* nos grupos LASER e SEM LASER. Este fato indica que, provavelmente, as injúrias metabólicas ocorridas durante o processo de criopreservação causam uma mudança na razão de trajetória da célula podendo ser benéfica ou não, visto que os dados de PIAI pós-descongelação (tabela 4) foram mais baixos, comparado ao do sêmen fresco.

Tabela 4 - Médias ( $\pm$  erros padrão), obtidas pela análise por citometria de fluxo das características das membranas plasmática e acrossomal (PIAI) e do alto potencial de membrana mitocondrial (APM), nas amostras descongeladas no T0, com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007)

<b>Características</b>	<b>LASER ANTES</b>	<b>LASER DEPOIS</b>	<b>SEM LASER</b>
<b>PIAI</b>	27,54 $\pm$ 1,41	29,26 $\pm$ 1,51	28,58 $\pm$ 1,51
<b>APM</b>	40,72 $\pm$ 1,57 <sup>b</sup>	43,38 $\pm$ 2,15 <sup>ab</sup>	47,42 $\pm$ 2,40 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente  $P < 0,05$ .

Na tabela 4, o grupo SEM LASER apresentou melhor quanto ao potencial de membrana mitocondrial, após a descongelação no T0, em relação ao grupo que recebeu o LASER ANTES da congelação, não diferindo do tratamento LASER DEPOIS da descongelação.

Nesta situação específica, o laser se comportou adversamente a hipótese do presente trabalho, piorando o potencial mitocondrial após a descongelação. Resultados do trabalho de Breitbart et al. (1996), indicam que potências de 10 mW de Laser He-Ne nas dosagens entre 0,6 e 7,2 J/cm<sup>2</sup>, inibem a captação de cálcio pela mitocôndria ( $P < 0,01$ ). Talvez essa inibição



tenha provocado uma alteração no metabolismo mitocondrial gerando dados contrários à hipótese formulada.

Quanto à integridade de membrana plasmática e acrossomal, não houve diferença significativa entre os grupos SEM LASER, LASER ANTES e LASER DEPOIS da congelação.

Tabela 5 - Médias ( $\pm$  erros padrão), obtidas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), nas amostras descongeladas no T2 (após 2 horas), com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007)

Características	LASER ANTES	LASER DEPOIS	SEM LASER
<b>CÉLS RÁPIDAS</b>	7,83 $\pm$ 1,40 <sup>a</sup>	2,40 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>	6,52 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup>
<b>MT</b>	9,08 $\pm$ 1,50 <sup>a</sup>	2,76 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>	7,28 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup>
<b>MPRO</b>	6,54 $\pm$ 1,34 <sup>a</sup>	2,00 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>	5,52 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>
<b>VAP</b>	76,57 $\pm$ 4,66 <sup>a</sup>	67,29 $\pm$ 4,68 <sup>b</sup>	76,72 $\pm$ 5,20 <sup>a</sup>
<b>VSL</b>	66,06 $\pm$ 4,01	58,94 $\pm$ 4,28	67,08 $\pm$ 4,65
<b>VCL</b>	136,41 $\pm$ 8,86	122,24 $\pm$ 9,16	136,69 $\pm$ 8,96
<b>ALH</b>	5,49 $\pm$ 0,30	4,86 $\pm$ 0,34	5,53 $\pm$ 0,24
<b>BCF</b>	31,24 $\pm$ 1,11	33,38 $\pm$ 1,23	31,97 $\pm$ 1,29
<b>STR</b>	86,62 $\pm$ 0,77	86,56 $\pm$ 0,94	86,80 $\pm$ 0,82
<b>LIN</b>	52,41 $\pm$ 1,54	50,48 $\pm$ 1,22	51,60 $\pm$ 1,65

MT – motilidade total; MPRO - motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL - velocidade progressiva; VCL - velocidade curvilínea; ALH – amplitude do deslocamento lateral da cabeça; BCF – frequência de batimento flagelar; STR – retilinearidade; LIN – linearidade. Letras diferentes na mesma linha significância  $P < 0,05$ .

Na tabela 5, após duas horas de incubação, as variáveis referentes às células rápidas, motilidade total, motilidade progressiva e velocidade de trajeto apresentaram resultado significativamente menor no grupo LASER DEPOIS da congelação, em relação ao tratamento com LASER ANTES da congelação e ao SEM LASER.

Neste caso o tratamento com LASER ANTES da congelação foi capaz de manter as características da célula durante o período de incubação. Este resultado confirma a hipótese de que aplicar o laser antes da congelação promove melhorias na viabilidade celular, fazendo com que o mesmo suporte o estresse da incubação.



Quando analisamos os dados separadamente, observa-se que os grupos após o tratamento laser apresentaram motilidade menos progressiva, mas com movimentação mais retilínea e linear. Esses achados corroboram com os dados de Muiño et al. (2007).

Os resultados de ALH, BCF, STR, LIN mantiveram as médias comparados com o sêmen descongelado no T0. Isso indica que durante a incubação a célula reduz o metabolismo para a produção de energia (as células não ficam ativas), mas mantém um metabolismo basal que assegura os movimentos espermáticos.

Quando se avaliou a preservação da célula ao longo do tempo houve interações entre tempo e tratamento, mostrando melhor comportamento do grupo LASER ANTES, como representado nos gráficos 3 a 6.

No trabalho de Muiño et al. (2007) também foram observadas mudanças nas subpopulações durante a criopreservação. Relatam a motilidade total no sêmen fresco de 34,1%, após a descongelação 20,6% MT, 15,2% MT após 2h de incubação e 7,3% MT após 4 h de incubação.

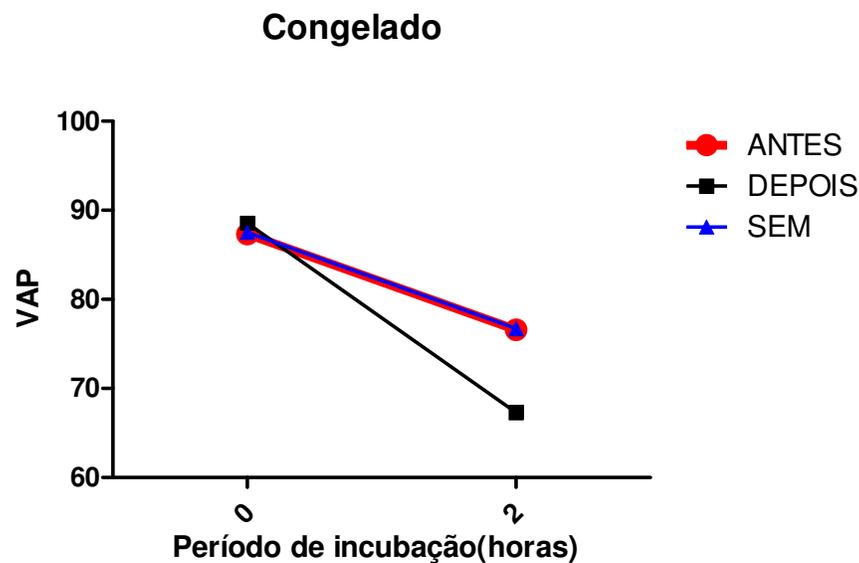


Gráfico 3 - Médias da variável VAP ao longo do tempo, mostrando interação tempo x tratamento obtidas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), nas amostras descongeladas (T0 e T2), com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007)



O gráfico 3 ilustra os resultados da velocidade de trajeto após duas horas de incubação. O grupo que recebeu o LASER ANTES da criopreservação e o grupo SEM LASER mostraram melhor tolerância à termo resistência. O fato do grupo que recebeu o LASER DEPOIS da descongelação não apresentar esta tolerância levanta a hipótese de que as células afetadas pela crioinjúria ficaram menos resistentes e responsivas a ação do LASER, perdendo mais rapidamente sua movimentação. Esta perda de movimentação do grupo SEM LASER pode não ser por danos na membrana, visto que após 2h de incubação os grupos que receberam LASER apresentaram melhores resultados de PIAI (tabela 6). O mesmo comportamento foi observado para os valores de VSL (gráfico 4), VCL (gráfico 5) e ALH (gráfico 6).

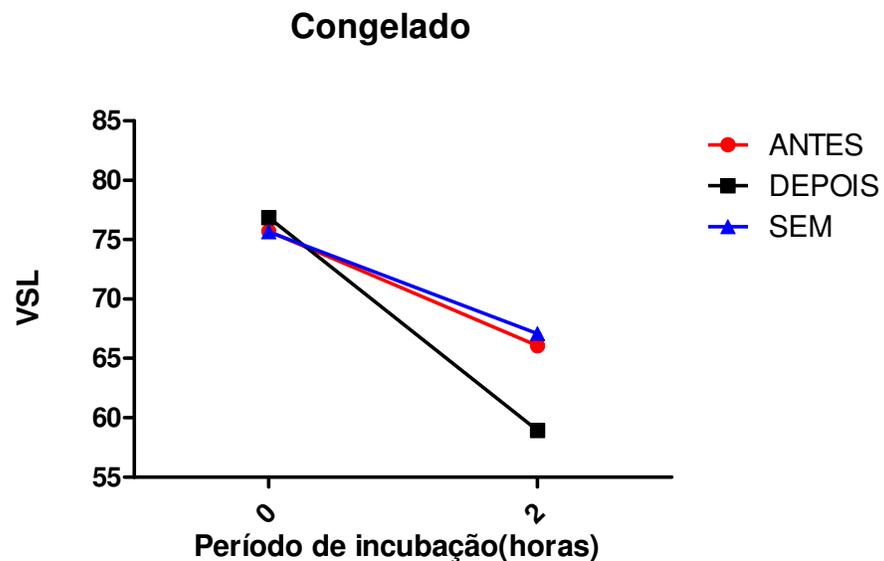


Gráfico 4 - Médias da variável VSL ao longo do tempo, mostrando interação tempo x tratamento obtidas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), nas amostras descongeladas (T0 e T2), com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007)



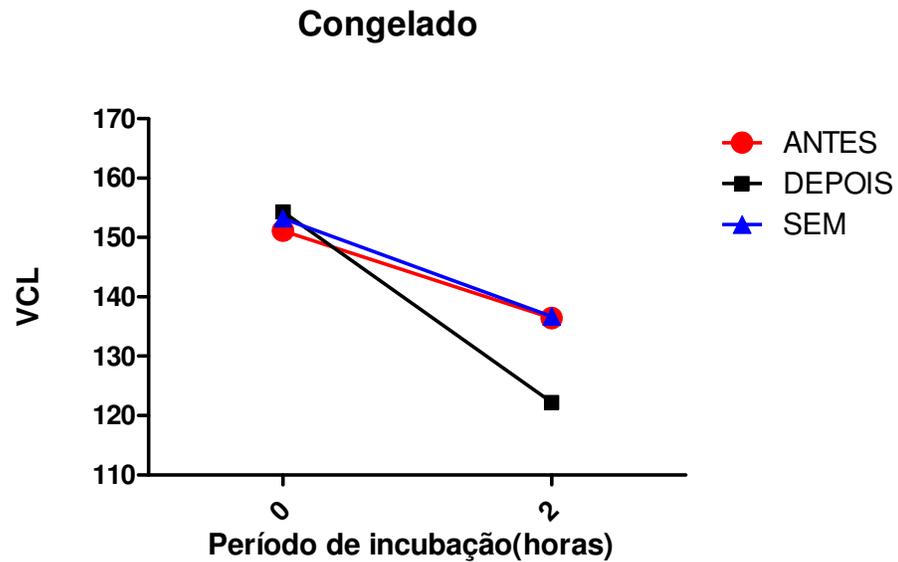


Gráfico 5 - Médias da variável VCL ao longo do tempo, mostrando interação tempo x tratamento obtidas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), nas amostras descongeladas (T0 e T2), com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007).

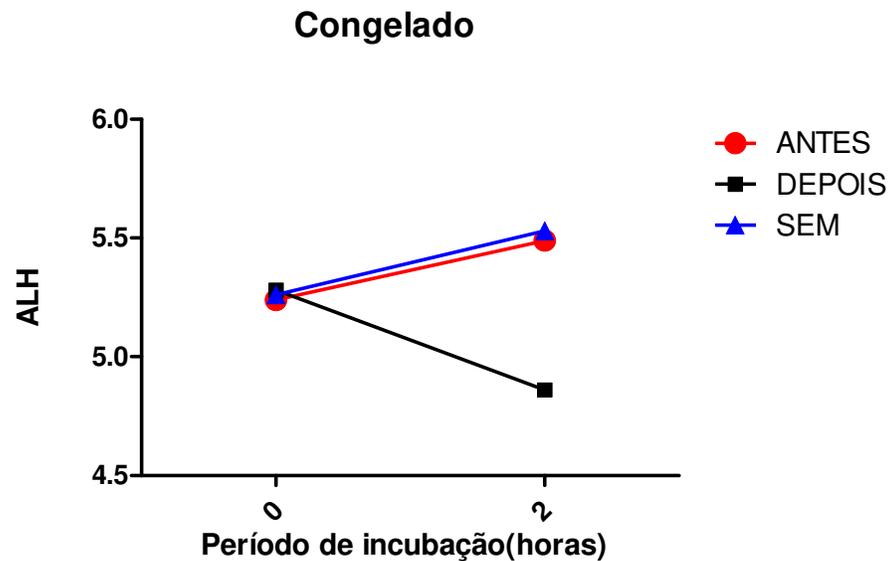


Gráfico 6 - Médias da variável ALH ao longo do tempo, mostrando interação tempo x tratamento obtidas pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA), nas amostras descongeladas (T0 e T2), com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelação) e SEM LASER (Pirassununga-2007)



Quando foi observado os valores de ALH (gráfico 6) houve aumento desta variável após 2h no tratamento LASER ANTES e SEM LASER. Com a diminuição do movimento no decorrer do tempo, a célula desloca mais fortemente a cabeça no intuito de conseguir realizar o movimento, talvez isso explique o aumento dos valores ao longo do tempo.

Tabela 6 - Médias ( $\pm$  erros padrão), obtidas pela análise por citometria de fluxo das características das membranas plasmática e acrossomal (PIAI) e do alto potencial de membrana mitocondrial (APM), nas amostras descongeladas no T2, com os tratamentos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelção) e SEM LASER (Pirassununga-2007)

Características	LASER ANTES	LASER DEPOIS	SEM LASER
PIAI	8,38 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	9,53 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>	6,27 $\pm$ 0,63 <sup>b</sup>
APM	27,65 $\pm$ 2,78	23,53 $\pm$ 1,23	25,84 $\pm$ 1,73

Letras sobrescritas na mesma linha diferem significativamente  $P < 0,05$ .

Na tabela 6, quando se observou a integridade das membranas plasmática e acrossomal após duas horas de incubação (T2), o grupo SEM LASER apresentou maior ( $P < 0,05$ ) dano de membrana em relação aos grupos LASER ANTES e LASER DEPOIS (da congelção), mostrando neste caso, que o laser proporcionou melhor resistência das membranas após o período de incubação.

A membrana plasmática regula a concentração de cálcio intracelular, principalmente pela bomba de cálcio ATP-dependente, pelo canal sódio/cálcio e pelo canal de cálcio voltagem-dependente. As vesículas da membrana plasmática podem acumular grandes quantidades de cálcio na presença de ATP, entretanto sem ATP a captação é menor (LUBART et al., 1997). No estudo desenvolvido por Lubart et al. (1997), os autores descreveram que 780 nm de irradiação de laser diodo estimulam a captação de cálcio, e seu efeito é ainda maior na ausência de ATP. Isto indica que a estimulação com 780 nm de luz aumenta a ligação de cálcio na membrana e não favorece o acúmulo nos espaços intravesicular. Acreditam que 780 nm de comprimento de onda afetam a conformação de alguma proteína isolada presente na membrana plasmática, que promove o aumento da ligação de cálcio nestes sítios.

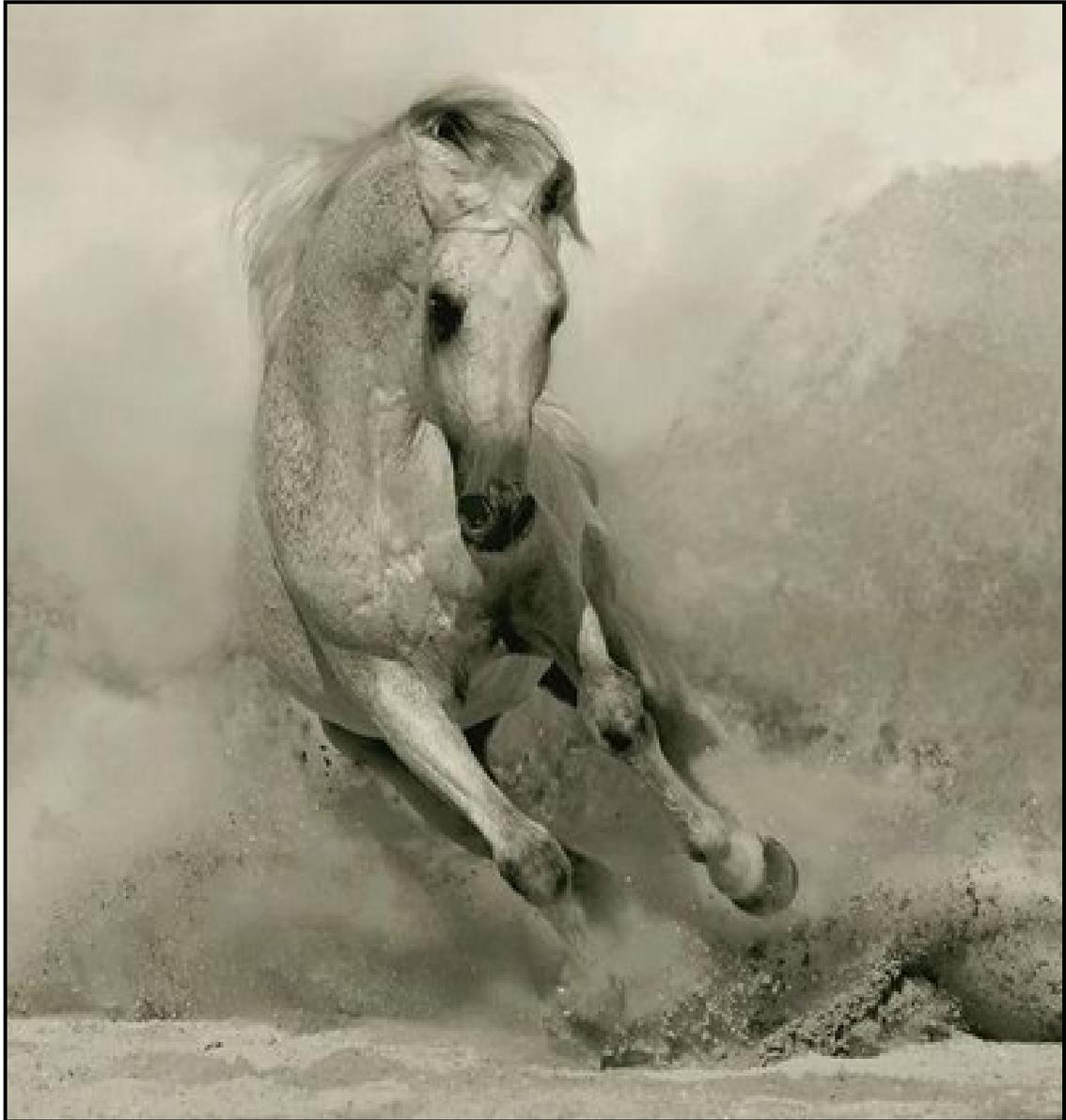
Alterações na ligação de cálcio, indubitavelmente podem alterar a concentração de cálcio intracelular, conduzindo efeitos estimulatórios. Altas doses de energia podem criar a



possibilidade de fechamento dos canais de íons ocasionando a morte celular (BREITBART et al., 1996).

No presente estudo pôde ser observado maior preservação das membranas plasmática e acrossomal ao longo do tempo de incubação, no grupo LASER ANTES da congelação. Esses achados corroboram com a afirmação de que a luz fóton altera o metabolismo celular. Neste caso, o comprimento de 650 nm de comprimento de onda de laser diodo, pode ter modificado a captação de cálcio pela membrana plasmática, promovendo uma maior manutenção ao longo do tempo. Estudos com outros comprimentos de onda, doses de energia e potência do raio devem ser conduzidos a fim de obter uma afirmação mais precisa sobre os benefícios da luz laser na célula espermática.





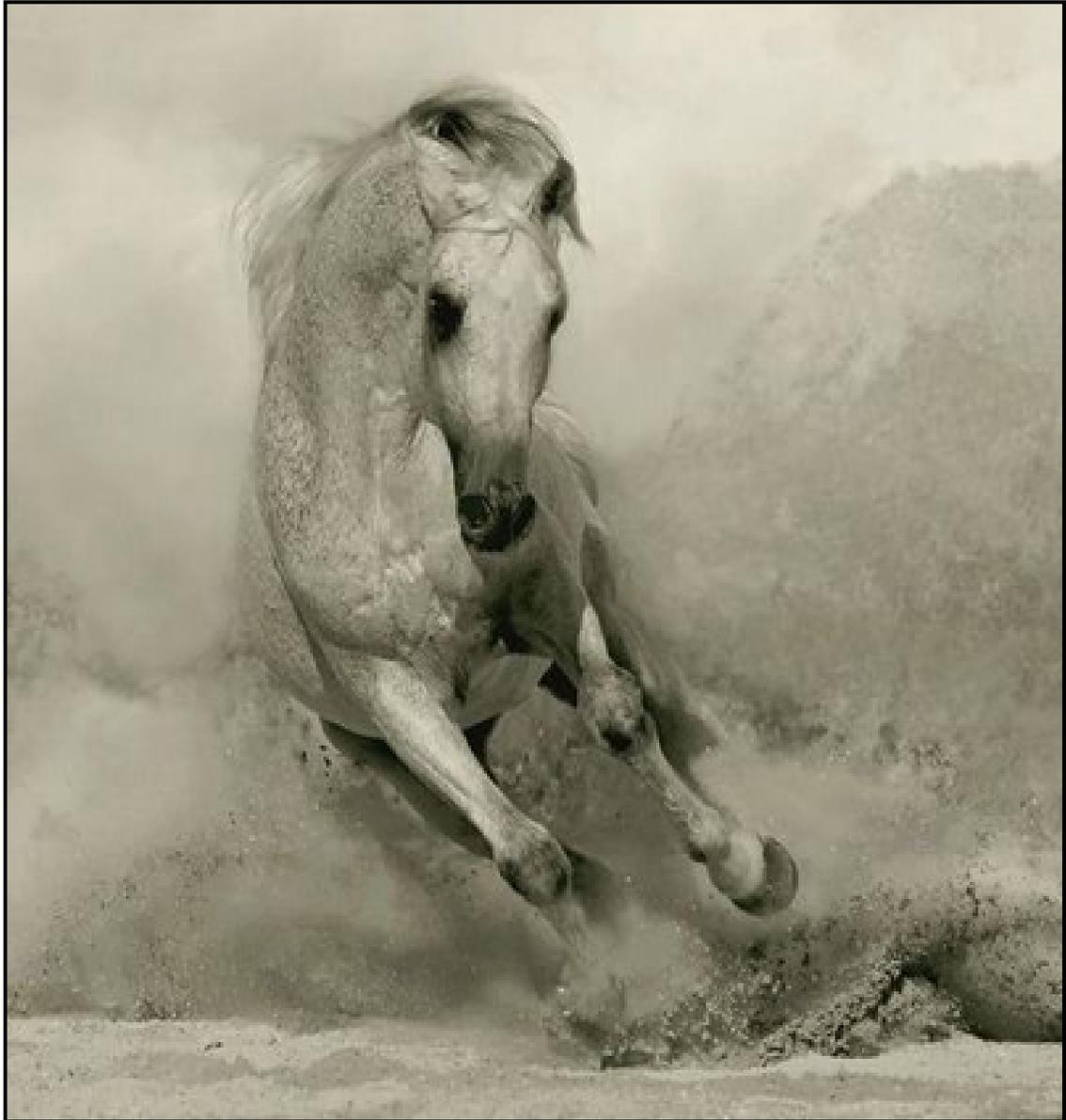
*7 Conclusão*

---

## 7 CONCLUSÃO

- ✓ A irradiação de 650 nm de comprimento de onda de laser diodo em espermatozoides eqüinos não alterou a motilidade e nem a viabilidade espermática
- ✓ O melhor momento de se aplicar o laser é antes da congelação confirmando a hipótese postulada.





*Referências*

---

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. **Fundamentos da biologia celular**: uma introdução a biologia molecular da célula. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294 p.
- ALLEN, W. R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 310-329, 2005.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. 1. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap. 80, p. 715-745.
- AMMAN, R. P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p. 145-173, 1987.
- ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M. M. K.; RAPHAEL, C. F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 190-194, 2007.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2000.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 230-231, 2003. Supplement.
- ARRUDA, R. P.; FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F. Efeitos da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 329, 2005. Supplement.
- BAGNATO, V. S. Os fundamentos da luz laser. **Física na Escola**, v. 2, n. 2, p. 4-9, 2001.
- BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, n. 22, p. 47-51, 2001.
- BAVISTER, B. D.; LEIBFRIED, M. L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 235-247, 1983.



- BAXTER, G. D. **Therapeutic lasers: theory and practice**. New York: Churchill Livingstone, 1994, p. 253.
- BLACH, E. L.; AMMAN, R. P.; BOWEN, R. A.; FRANTZ, D. Change in quality of stallion espermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. **Theriogenology**, v. 31, p. 283-298, 1989.
- BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINER, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 1, p. 75-88, 2001.
- BRANDÃO, A. C.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; MARTINS, J. F. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; VISINTIN, J. A. Influência do glicerol e etilenoglicol e da criopreservação sobre o complexo DNA-proteína de espermatozoides em garanhões. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 68-73, 2006. Suplemento.
- BRAUN, J.; HOCHI, S.; OGURI, N.; SATO, K.; TORRES BOGGINO, F. Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen/thawed stallion spermatozoa. **Cryobiology**, v. 32, n. 5, p. 482-492, 1995.
- BREITBART, H.; LEVINSHAL, T.; COHEN, N.; FRIEDMANN, H.; LUBART, R. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, n. 34, p. 117-121, 1996.
- BUDWORTH, P. R.; AMANN, R. P.; CHAPMAN, P. L. Relationship between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull sperm and fertility. **Journal of Andrology**, n. 9, p. 41-54, 1988.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in domestic animals**. 2007 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x). Disponível em <http://www.blackwell-synergy.com/loi/RDA> > Acesso em: (22/09/2007).
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Abstrats...**Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de reprodução Animal, 2004. p. 511.
- CENTOLA, G. M. Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. **Archives of Andrology**, v. 36, p. 1-7, 1996.
- CHARMAN, R. A. Cellular reception and emission of electromagnetic signals. **Physiotherapy**, v. 76, n. 9, p. 509-516, 1990.



- CHOI, Y. H.; VARNER, D. D.; HARTMAN, D. L.; HINRICHS, K. Blastocyst production from equine oocytes fertilized by intracytoplasmic injection of lyophilized sperm. **Animal Reproduction Science**, n. 94, p. 307-308, 2006.
- CORRAL-BAQUÉS, M. I.; RIGAU, T.; RIVERA, M.; RODRIGUEZ, J. E.; RIGAU, J. Effect of 655-nm diode laser on dog sperm motility. **Lasers in Medical Science**, v. 20, p. 28-34, 2005.
- COSSON, J. A. A moving image of flagella: news and views on the mechanism involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v. 20, n. 2, p. 83-94, 1996.
- DEVIREDDY, R. V.; SWANLUND, D. J.; ALGHAMDI, A. S.; DUOOS, L. A.; TROEDSSON, M. H. T.; BISCHOF, J. C.; ROBERTS, K. P. Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. **Reproduction**, n. 124, p. 643-648, 2002.
- DIAZ-PERES, E.; THOMAS, P.; MEIZEL, S. Evidence suggesting a role for sperm methaloendoprotease activity in penetration on zone-free hamster egg by human sperm. **Journal of Experimental Zoological**, v. 248, p. 213-221, 1988.
- EBNER, T.; MOSER, M.; YAMAN, C.; SOMMERGRUBER, M.; TEWS, G. Successful birth after laser assisted immobilization of spermatozoa before intracytoplasmic injection. **Fertility and Sterility**, v. 78, n. 2, p. 417-418, 2002.
- EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**, New York: Raven Press, 1994. p. 29-77.
- ENWEMEKA, C. S. Laser biostimulation of healing wounds: specific effects and mechanism of action. **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 9, p. 333-338, 1988.
- EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, n. 210, p. 1131-1133, 1980.
- FERREIRA, J. C. P.; NEVES NETO, J. R.; PAPA, F. O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, p. 131-32, 1997.
- FLESCH, L. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membranes in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.
- GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.



GRAHAN, J. K. Analysis of stallion sperm and its relation to fertility. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v 12, p. 119-130, 1996.

GRAHAN, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247, 2001.

GRAHAN, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrossomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

GRONDAHL, C.; GRONDAHL, M. L.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Acrossomal status in fresh and frozen-thawed stallion sperm evaluated by scanning electron microscopy. **Anatomy and Embryology**, v. 190, p. 195-200, 1994.

HADI, S.; TINIO, P.; AL-GHAITHI, K.; AL-QARI, H.; AL-HELALAT, M.; LEBWOHL, M.; SPENCER, J. Treatment of vitiligo using the 308-nm excimer laser. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 3, p. 354-357, 2006.

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

HOFFMANN, B.; LANDECK, A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p. 89-98, 1999.

HOLT, W. V.; VAN LOOK, K. J. W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. **Reproduction**, v. 127, p. 527-535, 2004.

IAFFALDANO, N.; MELUZZI, A.; MANCHISI, A., PASSARELLA, S. Improvement of stored turkey semen quality as a result of He-Ne laser irradiation. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 317-325, 2005.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; HAARD, M. G. M.; HAARD, M.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v. 52, p. 641-658, 1999.

JASKO, D. J.; HATHWAY, J. A.; SIMPER, W. D.; SQUIRE, E. L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 35, p. 1059-1067, 1992.

KANEPS, A. J.; HULTEREN, B. D.; RIEBOLD, T. W.; SHIRES, G. M. H. Laser therapy in horse: histopathologic response. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 3, p. 581-582, 1983.

KARESKOSKI, A. M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculated after storage. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p.33-38, 2006.



- KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; JOHN EDWIN, M.; VEERAPANDIAN, C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with *in vitro* fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 9-17, 2008.
- KATILA, T. Effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. **Animal Reproduction Science**, v 89, p 31-38, 2005.
- KIRK, E. S.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Comparison of *in vitro* laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**, n 64, p. 1422-1439, 2005.
- LAM, T. Low energy lasers selectively enhance collagen synthesis. **Lasers in Life Science**, v. 1, p. 61-77, 1984.
- LEHNINGER, A. L. Mitochondria and calcium ion transport. **Biochemistry Journal**, v. 118, p. 129-138, 1970.
- LOOMIS, P. R.; SQUIRES, E. L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, n. 64, p. 480-491, 2005.
- LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; LEVINSHAL, T.; LAVIEB, R.; BREITBART, H. Effect of light on calcium transport in bull sperm cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 15, p. 337-341, 1997.
- MAIYA, G. A.; KUMAR, P.; RAO, L. Effect of low intensity helium-neon (He-Ne) laser irradiation on diabetic wound healing dynamics. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 23, n. 2, p. 187-190, 2005
- MIKAIL, S.; PEDRO, C. R. **Fisioterapia veterinária**. Barueri, SP: Manole, 2006. 242 p.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAN, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Theriogenology**, v. 63, p. 2372-2381, 2005.
- MUIÑO, R.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; PEÑA, A. I. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, 2007 (doi: 10.1016/j.anireprosci. 2007.10.007). Disponível em <http://www.elsevier.com/locate/anireprosci> > Acesso em: (16/09/2008).
- NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Animal Reproduction Science**, n 60-61, p 245-262, 2000.
- NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E. K.; GADELLA, B. M. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma and acrossome membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1828-1835, 2003.



- OZDEMIR, F.; BIRTANE, M.; KOKINO, S. The clinical efficacy of low-power laser therapy on pain and function in cervical osteoarthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 3, p. 181–184, 2001.
- PAPA, F. O.; MELO, C. M.; FIORATTI, E. G.; DELL'AQUA JR, J. A.; ZAHN, F. S.; ALVARENGA, M. A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science** n 107, p. 293–301, 2008.
- PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipids composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.
- PINHEIRO, A. L. B.; MEIRELLES, G. C. S.; CARVALHO, C. M.; VIEIRA, A. L. B.; SANTOS, J. N.; RAMALHO, L. M. P. Biomodulative effects of polarized light on the healing of cutaneous wounds on nourished and undernourished Wistar Rats. **Photomedicine & Laser Surgery**, v. 24, p. 616-624, 2006.
- PORTER, M. Equine rehabilitation therapy for joint disease. **Veterinary Clinics Equine Practice**, n 21, p. 599–607, 2005.
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, n. 48, p. 36–45, 2004.
- RENNO, A. C. M.; MOURA, F. M.; SANTOS, N. S. A.; TIRICO, R. P.; BOSSINI, P. S.; PARIZOTTO, N. A. Effects of 830-nm laser light on preventing bone loss after ovariectomy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 5, p. 642-645, 2006
- ROCHA J. C. T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogenese. **RBPS**, v. 17, n. 1, p. 44-48, 2004.
- ROSSATO, M.; DI VIRGILIO, F.; RIZZUTO, R.; GALEAZZI, G.; FORESTA, C. Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 2, p. 119-128, 2001.
- SAMPER, J. C.; HELLANDER, J. C.; CRABO, B. G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 107-114, 1991. **Supplement**.
- SAS. STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. **SAS user's guide**: statistical. Version 8.2. Cary: SAS Institute Inc., 2003.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SOUZA, N. L. **Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados equinos**. 2001. 76 p. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2001.



SQUIRES, E. L. Integration of future biotechnologies into the equine industry. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p 187-198, 2005.

THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 786-793, 1998.

TROIANO, L.; GRANATA, A. R.; COSSARIZZA, A.; KALSHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stain ability in human sperm cells, a flow cytometry analysis with implication for male infertility. **Experimental Cell Research**, v. 241, p. 384-393, 1998.

TUNER, J.; HODE, L. **The laser therapy handbook**. Sweden: Prima Books, 2004. 589 p.

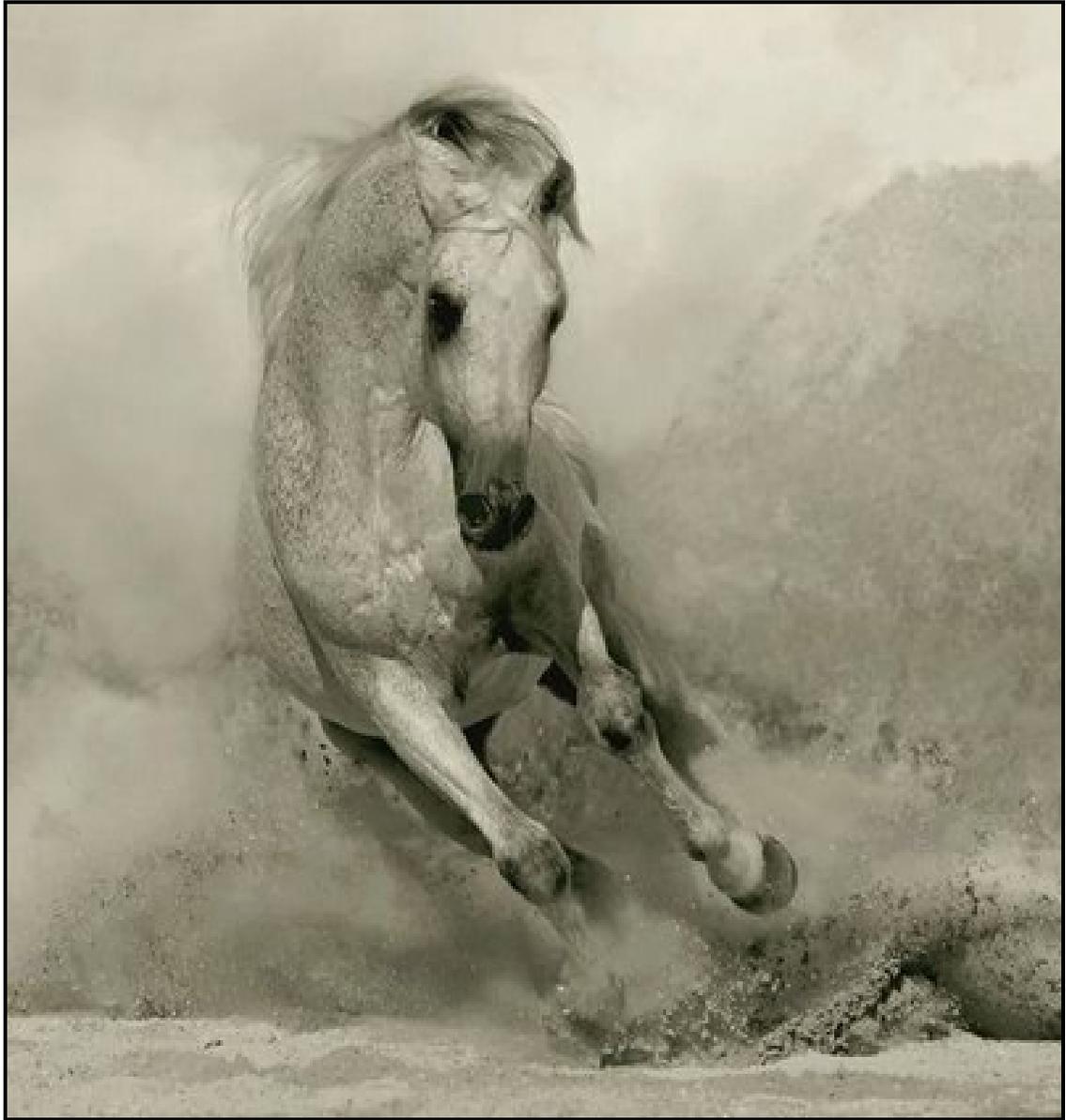
VERSTERGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANGA, J.; NOUEC, P.; COTTRON, S.; LE TELLIER, A.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. **Animal Reproduction Science**, n 68, p 201-218, 2001.

WHITFIELD, C. H.; PARKINSON, T. J. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine sperm by in vitro induction of acrossome reaction with calcium ionophore (A23187). **Theriogenology**, v. 44, p. 413-422, 1995.

WILHELM, K. M.; GRAHAN, J. K.; SQUIRES, E. L. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion sperm with sperm motion analysis, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. **Theriogenology**, v. 46, p. 559-578, 1996.





---

*Anexos*

---

**ANEXO A - SETUP EQUINO: HAMILTON THORNE BIOSCIENCES (Ultimate-Sperm Analyser)**

CARACTERÍSTICA	AJUSTE
Número de imagens adquiridas ( <i>Image capture: frames</i> )	30
Taxa de aquisição das imagens ( <i>Image capture: frames per séc</i> )	60 Hz/séc
Contraste mínimo da célula ( <i>Cell detection: minimum contrast</i> )	80
Tamanho mínimo da célula ( <i>Cell detection: minimum size</i> )	5 pixels
Tamanho para células imóveis ( <i>Default: cell size</i> )	7 pixels
Intensidade para células imóveis ( <i>Default: cell intensity</i> )	60
Referência de VAP para células progressivas ( <i>Progressive cells:VAP</i> )	30,0 µm/s
Referência de STR para células progressivas ( <i>Progressive cells:STR</i> )	80%
Referência de VAP para células lentas ( <i>Slow cells:VAP cut-off</i> )	20,0 µm/s
Referência de VSL para células lentas ( <i>Slow cells:VSL cut-off</i> )	15,0 µm/s
Limite superior do tamanho da célula ( <i>Qc plots: Static size gates-Max</i> )	2,48 pixels
Limite inferior do tamanho da célula ( <i>Qc plots: Static size gates-Min</i> )	0,29 pixels
Limite superior da intensidade da célula ( <i>Qc plots:Static intensity gates-Max</i> )	1,51
Limite inferior da intensidade da célula ( <i>Qc plots:Static intensity gates-Min</i> )	0,46
Limite superior de alongamento da célula ( <i>Qc plots:Cell elongation-Max</i> )	98%
Limite inferior de alongamento da célula ( <i>Qc plots:Cell elongation-Min</i> )	0%
Aumento ( <i>Optics: Magnification</i> )	1,89
Temperatura ( <i>Stage: Set stage temperature</i> )	37°C

---



---

**ANEXO B - TALP SPERM****1 SOLUÇÃO DE SAIS DE TALP (para preparar 500 mL)**

- ✓ NaCl.....2,1g
- ✓ KCl.....0,935g
- ✓ NaHCO<sub>3</sub>.....1,05g
- ✓ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,025g
- ✓ CaCl 2H<sub>2</sub>O.....0,145g
- ✓ MgCl 6H<sub>2</sub>O.....0,04g
- ✓ Hepes.....3,25g

**Preparo**

- ✓ Diluir CaCl 2H<sub>2</sub>O e MgCl 6H<sub>2</sub>O em 200 mL de água destilada
- ✓ Diluir os outros sais em 200 mL de água destilada
- ✓ Combinar as duas soluções e completar para 500 mL
- ✓ Filtrar e manter refrigerado

**2 SOLUÇÃO DOS METABÓLITOS GLICOSADOS****A – Solução Estoque (para preparar 50 mL)**

- ✓ Glicose.....2,5g
- ✓ Lactato de sódio.....9,25g
- ✓ Piruvato de sódio.....70mg
- ✓ Pen-strep.....12,5mL



## Preparo

- ✓ Dissolver todos os componentes
- ✓ Aliquotar (alíquotas de 5 mL)
- ✓ Manter em freezer

## B - Solução Trabalho

- ✓ Colocar 45 mL da solução de sais de TALP
- ✓ Ajustar o pH para 7,4
- ✓ Colocar 5 mL da solução estoque de metabólitos glicosados
- ✓ Filtrar em filtro de 0,45  $\mu\text{m}$
- ✓ Aliquotar (alíquotas de 300  $\mu\text{L}$ )
- ✓ Manter em freezer

## 3 – TALP SPERM (PREPARO DO DIA)

- ✓ 10 mL da sol. Sais de TALP
- ✓ 200  $\mu\text{L}$  da sol. Trabalho (metabólitos glicosados)
- ✓ 100 mg de soro albumina bovina (BSA)

## Preparo

- ✓ Dissolver o BSA em incubador por 10 minutos
- ✓ Ajustar o pH para 7,4
- ✓ Filtrar em filtro 0,45  $\mu\text{m}$



## ANEXO C - DILUIÇÃO TALP

### 1 – COM BSA

- ✓ 5 ml da sol. Sais de TALP
- ✓ 100 µL da sol. Trabalho
- ✓ 50 mg BSA

#### Preparo

- ✓ Dissolver o BSA em incubador por 10 minutos
- ✓ Ajustar o pH para 7,4 (25°C)

### 2 – COM PVA (Álcool polivinílico)

- ✓ 20 ml da sol de sais de TALP
- ✓ 400 µL da sol. Trabalho
- ✓ 20 mg de PVA

#### Preparo

- ✓ Dissolver o PVA em incubador por 10 minutos
- ✓ Ajustar o pH para 7,4 (25°C)



## ANEXO D - DILUIÇÕES E PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

1 – IODETO DE PROPÍDIO (PI, Sigma-Aldrich, 28,707-5 – 25mg)

SOLUÇÃO ESTOQUE (25 mg/mL)

- ✓ 25 mg de PI + 1 mL de DMSO

SOLUÇÃO TRABALHO (0,5 mg/mL)

- ✓ 20  $\mu$ L da sol. estoque de PI + 980  $\mu$ L de DPBS
- ✓ Armazenar em freezer, protegido da luz

2 – FITC – PSA (FITC – PSA, Sigma, L-0770 – 2 mg)

SOLUÇÃO TRABALHO (100  $\mu$ g/mL)

- ✓ 2 mg de FITC-PSA + 20 mL de DPBS + 10% de solução de azida de sódio  
10%
- ✓ Aliquotar e armazenar em freezer, protegido da luz

3 – JC-1 (Molecular Probes, T- 3168 – 5 mg)

SOLUÇÃO ESTOQUE (DMSO) – 1,53 Nm

SOLUÇÃO TRABALHO (DMSO) – 153  $\mu$ M



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)