

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ADIÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) NO DILUIDOR DE  
CONGELAÇÃO DE SÊMEN DE TOUROS**

**Marcio Pereira Soares**

**Porto Alegre**

**2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ADIÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) NO DILUIDOR DE  
CONGELAÇÃO DE SÊMEN DE TOUROS**

**Autor:** Marcio Pereira Soares

Tese apresentada como um dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, na área de concentração em Reprodução Animal, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Orientador:** Prof<sup>o</sup> Adriano Brandelli

**Porto Alegre**

**2012**

S676 Soares, Marcio Pereira, 1973-

Adição do ácido linoleico conjugado (CLA) no diluidor de  
congelamento de sêmen de touros / Marcio Pereira Soares.– Porto  
Alegre, 2012.

69 f. : il. color. ; 30 cm

Orientador: Adriano Brandelli.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

Bibliografia: f. 34-36; 53-55; 57-63.

1. Touro. 2. Sêmen. 3. Criopreservação. 4. Ácidos graxos. I.  
Brandelli, Adriano. II. Título.

CDU 636.2.082

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto Federal Catarinense,  
Campus Araquari - SC

MARCIO PEREIRA SOARES

**ADIÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) NO DILUIDOR DE  
CONGELAÇÃO DE SÊMEN DE TOUROS**

Aprovado em 31 de outubro de 2012

**APROVADO POR:**

---

Prof. Dr. Adriano Brandelli  
Orientador e Presidente da Banca

---

Profa. Dra. Enefer Rosana Oberst (UFRGS)  
Membro da Banca

---

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky (ULBRA)  
Membro da Banca

---

Prof. Dr. Ivan Bianchi (UFPEl)  
Membro da Banca

## Resumo

### ADIÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) NO DILUIDOR DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN DE TOUROS<sup>1</sup>

Autor: Marcio Pereira Soares

Orientador: Adriano Brandelli

#### RESUMO

O objetivo foi avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações dos isômeros cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12 do ácido linoleico conjugado (CLA) ao meio de congelação sobre a motilidade espermática, a integridade da membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides de touros. No experimento foram utilizados 4 touros Jersey, sendo os ejaculados processados na forma de “pool” (experimento 1) e individualmente (experimento 2). O meio base (MB) era constituído de tris (Dilutris<sup>®</sup>-SEMENCOM, Brasil) + 20 % de gema de ovo. Os tratamentos com CLA (Luta-CLA<sup>®</sup>-BASF, Brasil), tinham apresentação oleosa por isso foram preparados a partir do MB com adição de 1% de lauril sulfato de sódio (MBL). Os tratamentos foram compostos por: controle positivo (CP) = MB, controle negativo (CN) = MBL; tratamento 50 (T50) = MBL+50µM CLA; tratamento 100 (T100) = MBL+100µM CLA e tratamento 150 (T150) = MBL+150µM CLA. Após o descongelamento a qualidade espermática foi analisada pelo CASA, e a integridade das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial através da associação das sondas PI, FITC-PSA, JC-1 e H-342. Em ambos os experimentos não foram observadas diferenças entre os tratamentos nas concentrações utilizadas, para os parâmetros avaliados, porém no experimento 2 houve diferenças entre indivíduos.

**Palavras-chave:** touro, sêmen, criopreservação, ácidos graxos, ácido linoleico conjugado (CLA).

---

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias – Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, (69 p.). outubro de 2012.

*ADDITION OF CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA) IN THE  
CRYOPRESERVATION EXTENDER FOR BOVINE SEMEN*

*Author: Marcio Pereira Soares*

*Adviser: Adriano Brandelli*

**ABSTRACT**

The objective was to evaluate the effects of addition of different concentrations of the isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) to the freezing medium on sperm motility, the plasma membrane integrity, acrosomal and mitochondrial of bovine sperm. In the experiment, four Jersey bulls were used, and the ejaculates processed as "pool" (experiment 1) and individually (experiment 2). The diluent medium was based on tris (Dilutris<sup>®</sup>-SEMENCOM, Brazil) + 20% egg yolk (MB). The treatments with CLA (CLA-Luta<sup>®</sup>-BASF, Brazil), which had oily presentation, were prepared from MB with addition of 1% sodium lauryl sulfate (MBL). The treatments were: positive control (CP) = MB, negative control (CN) = MBL; treatment 50 (T50) = MBL+50 $\mu$ M CLA; treatment 100 (T100) = MBL+100 $\mu$ M CLA and treatment 150 (T150) = MBL+150 $\mu$ M CLA. After thawing the semen, the characteristics were analyzed by CASA, and the integrity of plasma and acrosomal membranes and mitochondrial function of sperm by association probes PI, FITC-PSA, JC-1 and H-342. In both experiments there were no differences between treatments and the conjugated linoleic acid (CLA), at the concentrations used, had no effect on the integrity and superior functionality of spermatozoa that underwent cryopreservation. However, but in experiment 2, there were differences between individuals.

Keywords: bull, semen, cryopreservation, fatty acids, conjugated linoleic acid (CLA).

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus centigrados
A1	Touro 1
A2	Touro 2
A3	Touro 3
A4	Touro 4
AI	Acrossomo intacto
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
APM	Células com alto potencial mitocondrial
BCF	Frequência de batimento
CASA	Computer-Assisted Semen Analysis - Sistema de análise computadorizado
CLA	Ácido linoleico conjugado
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DHA	Ácido docosahexaenoico
DPA	Ácido docosapentaenoico
EFA	Ácidos graxos essenciais
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPM	Erro padrão da média
FITC-PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada a isotiocionato de fluoresceína
H342	Hoechst 33342
Hz	Hertz
JC-1	Iodeto de 5,5', 6,6' - tetracloro - 1,1', 3,3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
LIN	Linearidade
LSD	Least Significant Difference
MB	Meio diluidor à base de Tris (Dilutris <sup>®</sup> -SEMENCOM, Brasil) +

	20% de gema de ovo
MBL	Meio diluidor à base de Tris (Dilutris <sup>®</sup> -SEMENCOM, Brasil) + 20% de gema de ovo + 1% de lauril sulfato de sódio
MÊS	Motilidade espermática subjetiva
MP	Motilidade progressiva
MPI	Membrana plasmática intacta
MT	Motilidade total
Nm	Nanômetro
PI	Iodeto de propídio
PIAIC	Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com função mitocondrial
PIAIS	Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e sem função mitocondrial
PIALC	Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e com função mitocondrial
PIALS	Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e sem função mitocondrial
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PLAIC	Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com função mitocondrial
PLAIS	Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e sem função mitocondrial
PLALC	Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com função mitocondrial
PLALS	Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e sem função mitocondrial
PUFA	Ácidos graxos polinsaturados
STR	Retilinearidade
T100	Tratamento 100
T150	Tratamento 150
T50	Tratamento 50
VAP	Velocidade média da trajetória



VCL	Velocidade curvilinear
VES	Vigor espermático subjetivo
VSL	Velocidade linear progressiva
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{m/s}$	Micrômetros por segundo

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
<b>3.</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO 1 - EFEITO DOS ISOMEROS CIS-9, TRANS-11 E TRANS-10, CIS-12 DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) SOBRE A INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DOS ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE BOVINOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Resumo .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3</b>	<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>27</b>
<b>3.5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>32</b>
<b>3.6</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>34</b>
<b>3.7</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO 2 - INFLUÊNCIA DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CIS-9, TRANS-11 E TRANS-10, CIS-12) SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE DIFERENTES TOUROS .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Resumo .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>51</b>
<b>4.6</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>53</b>
<b>4.7</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>53</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com a descoberta dos efeitos crioprotetores do glicerol em 1949, a criopreservação de sêmen de touros apresentou um grande avanço. Desde então, relativamente pouco progresso tem se obtido desta biotecnologia nesta espécie, pois os resultados práticos são considerados satisfatórios, apesar da importância e da grande aplicação do sêmen congelado na bovinocultura, mas ainda há muito que se estudar, já que uma grande parte das células apresenta alterações da integridade e/ou funcionalidade quando submetidas à criopreservação (HOLT, 2000).

Segundo Watson (1995) mesmo com toda a evolução ocorrida nesse processo é esperada uma redução de aproximadamente 50% na proporção de espermatozoides viáveis, pois devido ao estresse térmico, muitas células não resistem à congelação e morrem. No entanto, é necessário um número suficiente de espermatozoides que além de sobreviver, mantenham sua integridade estrutural e funcional para que ocorra o processo de fecundação.

As células espermáticas quando submetidas inicialmente ao processo de refrigeração e em seguida ao de congelação, passam por inúmeras situações de estresse osmótico pelos elevados gradientes de concentração de solutos do meio diluidor e pela formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular, os quais são responsáveis por mudanças na organização bidimensional dos lipídeos da membrana e também por alterações das propriedades de enzimas encontradas na membrana, diminuindo a longevidade dos espermatozoides após a descongelação (HOLT, 2000).

Segundo Eddy e O'Brien (1994) o espermatozoide mamífero tem dois componentes principais, a cabeça e o flagelo ou cauda, unidos pelo colo, contendo a membrana plasmática cobrindo toda a célula. A membrana plasmática é formada basicamente por uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas (endo e ectoproteínas), glicoproteínas de superfície e glicolipídeos organizados em um mosaico fluído (SINGER e NICHOLSON, 1972; ROBERTSON, 1981; EDDY e O'BRIEN, 1994).

Parks e Lynch (1992) trabalhando com sêmen de cachaço, touro, garanhão e galo determinaram a composição e comportamento na fase termotrófica dos lipídeos de membrana, de acordo com uma classificação baseada no grau de sensibilidade ao

choque frio. Os lipídeos do sêmen total e da membrana plasmática foram divididos em lipídeos neutros, glicolipídeos e fração de fosfolipídeos, além de esteróides livres e fosfolipídeos ligados a ácidos graxos. Entre os ácidos graxos ligados a fosfolipídeos foi caracterizada uma alta proporção de grupos docosapentanoicos e de docosahexanoicos nos espermatozoides das espécies de mamíferos.

Segundo Stubbs e Smith (1984) a relação entre taxa de ácidos graxos insaturados e saturados influencia nas propriedades físicas das membranas e, conseqüentemente na sua resistência ao frio. A ação dos ácidos graxos sobre a membrana plasmática, antes do congelamento, pode estar relacionada ao aumento na conversão de ácidos graxos insaturados e com isso alterando a fluidez da membrana (TOMINAGA et al., 2000), mas a fluidez da membrana plasmática dos espermatozoides é específica para cada espécie e existe ainda uma variação entre indivíduos (GIRAUD et al., 2000).

Visando determinar os efeitos dos ácidos graxos sobre a membrana diversos trabalhos foram realizados com sua adição aos meios de diluição de sêmen, bem como de maturação e cultivo de oócitos e embriões. Imai et al. (1997), Okazaki et al. (1997) e Hochi et al. (1999) utilizaram o ácido oleico-linoleico em embriões bovinos; Pérez-Pé et al. (2001) adicionaram o ácido oleico-linoleico ao sêmen ovino; Hossain et al. (2007) empregaram o ácido oleico e linoleico em sêmen suíno; Kaeoket et al. (2010) introduziram o ácido docosahexaenoico (DHA) no sêmen suíno; Nasiri et al. (2012) utilizaram os ácidos graxos polinsaturados (PUFA) da família ômega-3 no sêmen bovino e Takahashi et al. (2012) adicionaram o ácido linoléico no sêmen de touro.

Recentemente, trabalhos demonstram que os isômeros *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoléico conjugado (CLA) podem agir em sistemas biológicos de forma diferente. Os resultados da adição de isômeros *trans*-10, *cis*-12 do CLA ao meio de cultivo demonstraram aumento na criotolerância de embriões bovinos (PEREIRA et al., 2007, 2008), porém Darwich et al. (2010) avaliaram os mesmos isômeros na criotolerância de embriões da mesma espécie e não observaram aumento na sobrevivência embrionária após a criopreservação.

O CLA é um termo comum para um grupo de ácidos octadecadienoicos, que são isômeros conjugados posicionais e geométricos do ácido linoléico (C18:2), em que as duplas ligações são separadas por uma ligação simples carbono-carbono no lugar de um grupo metileno, dois dos quais (*cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 CLA) possuem

atividades biológicas (PARIZA et al., 2001). O 18:2 (*cis*-9, *trans*-11) é considerado a forma primária de CLA presente naturalmente nos alimentos, ainda que o 18:2 (*cis*-9, *trans*-11) e o 18:2 (*trans*-10, *cis*-12) sejam os dois isômeros predominantes e presentes em níveis semelhantes no CLA sintético (CHIN et al., 1992).

A adição de ácidos graxos pode influenciar a estabilidade das membranas frente à criopreservação. Considerando que relativamente poucos estudos têm relatado o efeito de ácidos graxos insaturados sobre a membrana espermática, neste trabalho foram investigados os efeitos da adição de ácidos graxos dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA) ao meio de diluição sobre a integridade e funcionalidade dos espermatozoides de touros submetidos ao processo de congelação.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da adição dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA) ao meio de diluição sobre a integridade e funcionalidade dos espermatozoides bovinos submetidos ao processo de congelação.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

a) Avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA) no meio de congelamento sobre a motilidade espermática, a integridade da membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides de touros.

b) Verificar a influência da adição de diferentes concentrações dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA), ao meio de congelação de sêmen, por meio da avaliação da motilidade espermática, integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, através da análise individual dos animais utilizados.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Espermatozoide**

Os espermatozoides são células alongadas divididas em dois componentes principais, que são a cabeça e o flagelo (FLESCHE e GADELLA, 2000), sendo produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos por um longo processo chamado de espermatogênese (CHENG, 2004).

A cabeça do espermatozoide contém uma pequena quantidade de citoplasma, o núcleo e o acrossomo (ÕURA e TOSHIMORI, 1990; FLESCHE e GADELLA, 2000), tendo como principal função a liberação do material genético, contido no núcleo, para o oócito (MORTIMER, 1997).

O núcleo espermático, que está envolvido pelo envelope nuclear, possui em seu interior a cromatina, altamente condensada e apresenta organização e quantidade de DNA características (AMANN e GRAHAM, 1993; EDDY e O'BRIEN, 1994; ROUX et al., 2004).

O acrossoma é uma organela derivada do complexo de Golgi que se espalha recobrando o núcleo como uma capa sobre a porção anterior da cabeça do espermatozoide. No interior da organela estão alojadas várias enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração da matriz extracelular do oócito (zona pelúcida) para que ocorra a fecundação (FLESCHE e GADELLA, 2000; ASHIZAWA et al., 2004).

A estrutura da organela consiste em duas membranas: a membrana acrossomal externa e a membrana acrossomal interna. No processo de reação acrossômica, a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática se fundem e formam vesícula, ocorrendo a liberação das enzimas e outros componentes da matriz acrossomal com a liberação do conteúdo acrossomal. Já a membrana acrossomal interna e o segmento equatorial persistem até a fusão do espermatozoide com o oócito (ÕURA e TOSHIMORI, 1990; EDDY e O'BRIEN, 1994; FLESCHE e GADELLA, 2000; ASHIZAWA et al., 2004).

O flagelo é a primeira estrutura a se formar durante a espermatogênese com o recrutamento das mitocôndrias do citoplasma para formar um arranjo helicoidal em sua peça intermediária (FLESCHE e GADELLA, 2000), sendo composto pela peça intermediária, peça principal e peça terminal (ÕURA e TOSHIMORI, 1990; EDDY e O'BRIEN, 1994; COSSON, 1996; MORTIMER, 1997).

O axonema constitui a parte interna do flagelo, sendo uma estrutura especializada do citoesqueleto, responsável pela motilidade espermática, formado por um anel de nove microtúbulos duplos localizados na periferia do cilindro e envoltos por dois microtúbulos simples centrais (ÕURA e TOSHIMORI, 1990; EDDY e O'BRIEN,

1994; COSSON, 1996). A união de cada par de microtúbulo periférico é realizada pela dineína, a qual é responsável pela hidrólise de ATP em ADP e fosfato inorgânico, transformando a energia química em trabalho mecânico permitindo o deslizamento dos microtúbulos que leva ao batimento axonemal (COSSON, 1996; MORTIMER, 1997, 2000).

As mitocôndrias estão localizadas na peça intermediária e ficam dispostas em um arranjo espiral que produz a energia necessária para o movimento espermático e se estende do colo até o anulus. Já a peça principal possui uma bainha fibrosa que rodeia o axonema fornecendo um suporte ao movimento flagelar e se estende do anulus até a peça terminal, a qual é composta apenas pelo axonema coberto pela membrana plasmática (COSSON, 1996; MORTIMER, 1997).

## **2.2. Membrana plasmática**

A membrana plasmática é a estrutura mais externa e envolve todo o espermatozoide. O modelo estrutural básico da membrana espermática é caracterizado por ser uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídeos organizados em um mosaico fluido (SINGER e NICHOLSON, 1972; ROBERTSON, 1981; EDDY e O'BRIEN, 1994), apresentando uma estrutura altamente dinâmica e contendo aproximadamente 70% de fosfolipídeos, 25% de lipídeos neutros e 5% de glicolipídeos (FLESH e GADELLA, 2000).

Com os avanços científicos, o modelo do mosaico fluido tornou-se mais complexo incluindo conceitos como a distribuição lipídica, a assimetria da bicamada (translocases ATP-dependente), polimorfismo dos lipídeos e interação lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína (PARKS e GRAHAM, 1992; JANUSKAUSKAS et al., 2003).

As proteínas integrais e periféricas são aproximadamente 50% do peso da membrana, e estão entremeadas ao longo da bicamada lipídica. As proteínas integrais estão localizadas na bicamada lipídica e são canais através da membrana; já as proteínas periféricas podem ser facilmente removidas da membrana (AMANN e GRAHAM, 1993).

Os fosfolipídeos da membrana do espermatozoide são distribuídos assimetricamente entre a camada bilipídica, sendo que a fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina estão localizadas na face interna da camada, enquanto a esfingomiélnina e a fosfatidilcolina ficam na camada externa (HAMMERSTEDT et al., 1990; GADELLA et al., 1999).

Como principais componentes lipídicos dos espermatozoides os fosfolípidos são os caracterizados por conterem grandes quantidades de PUFA (MARTIN RILLO et al., 1996), derivados principalmente do ácido linoleico, importantes na manutenção da fluidez e da flexibilidade da membrana (LENZI et al., 1996), sendo que as diferenças no comprimento e na saturação da cauda de ácidos graxos são importantes, pois influenciam na habilidade das moléculas de fosfolípidos em se agrupar, afetando, conseqüentemente, a fluidez da membrana (ALBERTS et al., 2004).

A característica de fluidez da membrana plasmática é conferida pelos fosfolípidos e depende tanto da composição quanto da temperatura, sendo que a mudança de estado líquido para o gel em membranas com maior proporção de lípidos de cadeia insaturada se dará em menores temperaturas (ALBERTS, 1997).

Com a diminuição da temperatura (19°C a 5°C) das células espermáticas, durante o processo de resfriamento que antecede o congelamento, a membrana passa por uma fase de trânsito do estado fluido para o estado líquido-cristalino (AMANN e PICKETT, 1987) e isso leva a uma desestabilização da membrana plasmática do espermatozoide (BARRERA-COMPEAN et al., 2005).

### **2.3 Ácidos graxos**

O organismo animal não pode sintetizar os ácidos graxos essenciais (EFA), a síntese ocorre somente nos vegetais e, portanto, os animais devem ser suplementados na dieta. Já os mamíferos podem realizar a conversão metabólica dos ácidos graxos de uma mesma família, que é realizada por meio de processos de alongação e dessaturação de suas cadeias, o que dá origem a uma série de ácidos graxos que possuem maior número de carbonos, os quais são chamados de PUFA (MCDOWELL, 1989).

A classificação mais simples dos EFA é baseada no número de carbonos entre o grupo metil terminal e primeiro duplo enlace, sendo agrupados nas famílias ômega-6 e ômega-3 (LAPOSATA, 1995). Na família ômega-6 o ácido araquidônico é derivado do ácido linoleico, já na família ômega-3 o ácido eicosapentaenoico (EPA), o ácido docosahexanoico (DHA) e o ácido docosapentanoico (DPA) são derivados do ácido alfa-linolênico (MCDOWELL, 1989).

Segundo Abayasekara e Whates (1999), o crescimento neonatal, o desenvolvimento de atividades cerebrais e visão, a alteração na produção de leucotrienos, a participação do metabolismo das prostaglandinas e a composição das



membranas celulares são funções essenciais no corpo, das quais a família ômega-3 e 6 participam de uma forma ampla.

O armazenamento das famílias ômega-3 e ômega-6 ocorre na forma esterificada nos fosfolipídeos dos folhetos citosólico da célula e membranas das organelas ou em corpos lipídicos ligados à glicídeos neutros e aos fosfolipídeos polares (SCHMITZ e ECKER, 2008).

#### **2.4 Ácidos graxos e as membranas celulares**

Os ácidos graxos, como componentes dos fosfolipídeos das membranas celulares, podem afetar as propriedades e a interação entre os seus componentes que estão diretamente relacionados com o transporte de proteínas, atividade enzimática e receptores de membrana (ROCHE, 1999).

Sudheera et al. (1997) consideraram que os ácidos graxos polinsaturados podem influenciar a fluidez das membranas e a atividade de enzimas necessárias para a produção de energia, além de muitas funções dos receptores dependentes de lipídeos-proteína, sendo que qualquer mudança na composição dos ácidos graxos pode afetar a membrana plasmática.

As análises histoquímicas dos lipídeos da porção mediana do espermatozoide demonstraram a presença de quantidades significativas de lipídeos na cauda e porção mediana do espermatozoide, que são constituídos de lipoproteínas e estão associados principalmente com a bainha mitocondrial, que circunda o filamento axial, e com a cauda do espermatozoide (MIESCHER, 1897 citado por MANN, 1964).

Durante a fase de maturação espermática no epidídimo ocorre um aumento na proporção de PUFA, devendo ter efeito pronunciado nas propriedades físicas e químicas da membrana lipoproteica (VANDENHEUVEL, 1971).

Os PUFA foram detectados nos espermatozoides de várias espécies de mamíferos incluindo os ruminantes (POULOS et al., 1986), sendo que o DHA representa aproximadamente 55% do total de ácidos graxos dos espermatozoides bovinos, concentrado em forma de fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (PETERS e BALL, 2004).

#### **2.5 Ácidos graxos e a criopreservação celular**

A membrana plasmática de espermatozoide submetida a baixas temperaturas sofre modificações na estrutura lipídica e na permeabilidade, o que parece reduzir a viabilidade e funções fisiológicas espermáticas (HOLT, 2000).

As mudanças de temperatura, que ocorrem durante o resfriamento, produzem alterações físicas na membrana que está passando do estado líquido ao de gel, momento que as cadeias de ácidos graxos estão aleatoriamente distribuídas e ordenam-se paralelamente, o que produz uma estrutura rígida, tornando estas áreas fracas e susceptíveis a rupturas, fusões e permeáveis a íons e a perda de seus arranjos celulares, causando danos irreparáveis às células (AMANN e PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995; HOLT, 2000).

Segundo Watson (1981), a sensibilidade ao choque térmico varia de acordo com o grau de maturação dos espermatozoides, com a espécie, com a qualidade do plasma seminal, podendo ser determinada pelo conteúdo de colesterol na membrana e o grau de saturação de ácidos graxos da membrana.

As espécies que apresentam espermatozoides mais resistentes ao choque térmico são aquelas nas quais as células espermáticas contêm maior concentração de colesterol na membrana, menor superfície da cabeça do espermatozoide e maior proporção de ácidos graxos insaturados em relação aos saturados, o que proporciona maior fluidez de membrana (ALBERTS et al., 1997; STUBBS e SMITH, 1984; HENRICKS, 1991).

Com o intuito de minimizar os danos ocasionados pela criopreservação celular, a adição de ácidos graxos ao meio de cultivo e criopreservação embrionário tem sido descrito por vários pesquisadores. Imai et al. (1997) observaram que a adição de ácido oleico-linoleico em meio de cultivo *in vitro* não influenciou a habilidade dos embriões bovinos oriundos da produção *in vitro* de embriões (PIV) evoluírem para os estágios de blastocisto e blastocisto expandido, porém aumentou a sobrevivência destes após a criopreservação. Okazaki et al. (1997), também investigando o efeito do ácido oleico-linoleico como suplemento ao meio de criopreservação de blastocistos bovinos oriundos de PIV, não observaram aumento significativo da proporção de blastocistos sobreviventes ou em eclosão após a congelação. Mórulas bovinas produzidas *in vitro* e expostas em meio de cultura no qual um dos componentes era o ácido oleico-linoleico mostraram ser relativamente tolerantes à criopreservação (Hochi et al. 1999). A adição de isômeros *trans-10*, *cis-12* do CLA ao meio de cultivo demonstraram aumento na criotolerância de embriões bovinos (PEREIRA et al., 2007, 2008), porém Darwich et al.

(2010) avaliaram os mesmos isômeros na criotolerância de embriões e não observaram aumento na sobrevivência embrionária após a criopreservação.

Na criopreservação de sêmen os ácidos graxos também foram testados em diversas espécies. Pérez-Pe et al. (2001) descrevem o efeito benéfico do ácido oleico-linoleico ao meio de congelação de sêmen ovino. Hossain et al. (2007) observaram melhora nas motilidade e viabilidade espermática de espermatozoides suíno com ácido oleico e linoleico. Kaeoket et al. (2010) obtiveram elevada motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática com ácido docosahexaenoico (DHA) ao diluidor de sêmen suíno. Nasiri et al. (2012) adicionaram ácidos graxos polinsaturados (PUFA) ao diluidor de sêmen bovino e observaram melhora na qualidade espermática no sêmen descongelado, especialmente do DHA. Takahashi et al. (2012), com o uso de ácido linoleico no meio de diluição, observaram um melhora na motilidade dos espermatozoides descongelados de touro que apresentava baixa congelabilidade espermática.

## 2.6 Ácido linoleico conjugado (CLA)

O ácido linoleico conjugado (CLA) é um termo comum para um grupo de ácidos octadecadienoicos, que são isômeros conjugados posicionais e geométricos do ácido linoleico (C18:2), em que as duplas ligações são separadas por uma ligação simples carbono-carbono no lugar de um grupo metileno, dois dos quais (*cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 CLA) possuem atividades biológicas (PARIZA et al., 2001). O 18:2 (*cis*-9, *trans*-11) é considerado a forma primária de CLA presente naturalmente nos alimentos, ainda que o 18:2 (*cis*-9, *trans*-11) e o 18:2 (*trans*-10, *cis*-12) sejam os dois isômeros predominantes e presentes em níveis semelhantes no CLA sintético (CHIN et al., 1992).

Segundo Pariza et al. (2001), os isômeros *trans*-10, *cis*-12 e o *cis*-9, *trans*-11 do CLA são os mais conhecidos e também os que se apresentam em maior abundância. O efeito do CLA na composição corporal e no metabolismo lipídico em culturas de células é induzido pelo *trans*-10, *cis*-12, e o crescimento e eficiência alimentar parece estar mais relacionado com o *cis*-9, *trans*-11.

O mecanismo de ação e a base molecular para os efeitos divergentes de isômeros CLA permanecem obscuros, apesar de numerosos estudos experimentais em animais e cultivo celular (ZHAO et al. 2011a). Embora seja possível que pelo menos alguns dos efeitos de CLA ocorram por meio da modificação da estrutura e função da membrana

(STULNIG et al., 2001; LIU et al., 1994, LI et al., 2005, MA et al., 2004), a dinâmica molecular das bicamadas lipídicas puras compostas dos dois isômeros revelou muito pouca diferença estrutural e nas propriedades dinâmicas (ZHAO et al., 2011a).

Visando observar os efeitos do CLA sobre a membrana plasmática, diversos trabalhos foram conduzidos com oócitos e embriões bovinos. Pereira et al. (2007) examinaram os efeitos da suplementação do meio de cultivo de embriões bovinos com o isômero *trans-10 cis-12* e observaram que a criopreservação melhorou significativamente. O isômero *trans-10 cis-12* adicionado ao meio de cultivo embrionário proporcionou uma significativa resistência dos embriões produzidos *in vitro* para micromanipulação e criopreservação (PEREIRA et al., 2008). Darwich et al. (2010) avaliaram a suplementação com os mesmos isômeros ao meio de cultivo embrionário e não observaram aumento na sobrevivência embrionária após a criopreservação. Lapa et al. (2011) investigaram o efeito do isômero *trans-10 cis-12* sobre a maturação do oócito e composição lipídica do complexo cumulus oócito e observaram que o isômero interferiu no metabolismo lipídico melhorando a competência do oócito para chegar a um embrião de melhor qualidade.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO 1

## EFEITO DOS ISOMEROS CIS-9, TRANS-11 E TRANS-10, CIS-12 DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) SOBRE A INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DOS ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE BOVINOS

Marcio Pereira Soares<sup>1</sup>, Adriano Brandelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS.

### ABSTRACT

The experiment was carried out to evaluate the effects of adding different concentrations of the isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) in the freezing medium on sperm motility, the plasma membrane integrity, acrosomal and mitochondrial bovine sperm. Four Jersey bulls were used, and the ejaculates processed as "pool". The extender used was based on Tris (Dilutris<sup>®</sup>-SEMENCOM, Brazil) + 20% egg yolk (MB). The treatments with CLA (Luta-CLA<sup>®</sup>-BASF, Brazil), which had oily presentation, were prepared from MB with addition of 1% sodium lauryl sulfate, denominated MBL. The treatments were CP = MB, CN = MBL, T50 = MBL+50 $\mu$ m, T100 = MBL+100 $\mu$ m, T150 = MBL+150 $\mu$ M. The medium used was Tris, yolk egg and glycerol (MB). The characteristics of the post-thaw semen were analyzed by computerized analysis system (CASA), and plasma membrane integrity and acrosomal and mitochondrial function assessed by the association of the fluorescent probes PI, FITC-PSA, JC-1 and H-342. No differences were observed between treatments. The conjugated linoleic acid (CLA), at the concentrations used, did not show effects on the integrity and functionality of bovine sperm submitted to cryopreservation.

Keywords: bulls, semen cryopreservation, fatty acids, conjugated linoleic acid (CLA).

### RESUMO

O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA) ao meio de congelação sobre a motilidade espermática, a integridade da membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides de touros. Foram utilizados 4 touros Jersey, sendo os ejaculados processados na forma de “*pool*”. O diluidor utilizado foi à base de Tris (Dilutris<sup>®</sup>-SEMENCOM, Brasil) + 20 % de gema de ovo (MB). Os tratamentos com CLA (Luta-CLA<sup>®</sup>-BASF, Brasil), devido à apresentação oleosa foram preparados a partir do MB com adição de 1% de lauril sulfato de sódio, sendo denominado MBL. Os tratamentos foram compostos por: CP = MB, CN = MBL; T50 = MBL+50µM CLA; T100 = MBL+100µM CLA e T150 = MBL+150µM CLA. As características do sêmen descongelado foram analisadas pelo sistema de análise computadorizado (CASA), e a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial avaliadas pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA, JC-1 e H-342. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos. O ácido linoleico conjugado (CLA), nas concentrações utilizadas, não apresentou efeitos sobre a integridade e funcionalidade dos espermatozoides bovinos submetidos à criopreservação.

Palavras-chave: touro, sêmen, criopreservação, ácidos graxos, ácido linoleico conjugado (CLA).

## INTRODUÇÃO

Ácido linoleico conjugado (CLA) é a denominação utilizada para definir um conjunto de isômeros posicionais e geométricos do ácido octadecadienoico com duplas ligações conjugadas, que podem ser encontradas nas posições 9 e 11, 10 e 12, entre outras, e podem ser em ambas configurações, *cis* e *trans*, ocorrendo naturalmente em produtos lácteos e carne de ruminantes (PARIZA, 2004; WAHLE et al., 2004).

O CLA, assim como os ácidos graxos essenciais (ácido linoleico e linolênico) e os ácidos graxos polinsaturados (PUFA), são conhecidos por alterarem a composição da membrana lipídica em diversas células (SAMPATH e NTAMBI, 2005), sendo incorporados pelas células nos lipídeos da membrana plasmática (RINGSEIS et al.,

2008; AMARU e FIELD, 2009) provocando modificações na sua estrutura e função (ZHAO et al., 2011a; SUBBAIAH et al., 2011; ZHAO et al., 2011b).

Os efeitos da utilização dos ácidos graxos nos meios de maturação e cultivo embrionário sobre a fluidez da membrana são relatados por Hochi et al. (1999) que relacionaram os resultados ao aumento da conversão de ácidos graxos insaturados na membrana embrionária, antes do congelamento, e com isso alterando a fluidez da membrana, que pode vir a melhorar a habilidade do embrião ao congelamento.

No sêmen ovino a adição do ácido oleico-linoleico ao meio de congelamento demonstrou um efeito benéfico na preservação da viabilidade das células espermáticas (PÉREZ-PE et al., 2001). Espermatozoides suínos incubados, por 4 horas a 37°C, em meio de diluição com ácido oleico e linoleico demonstraram melhora significativa na motilidade e viabilidade (HOSSAIN et al., 2007). Takahashi et al. (2012) utilizaram o ácido linoleico no meio de criopreservação de sêmen bovino e observaram uma melhora na motilidade dos espermatozoides após o descongelamento, relacionando o resultado a possível manutenção da fluidez da membrana em função da incorporação do ácido linoléico pela bicamada lipídica.

Os efeitos da adição de CLA aos meios de diluição e congelamento de sêmen em bovinos e sua interação com as células espermáticas ainda não foram relatados. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA) no meio de congelamento sobre a motilidade espermática, a integridade da membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Colheita de sêmen**

Foram utilizados 4 touros da raça Jersey em idade reprodutiva, com condição corporal (escore  $\geq 4$ , escala 1 a 5), mantidos sob as mesmas condições ambientais e alimentares. Os ejaculados foram obtidos com vagina artificial, sendo realizada uma colheita por semana. Somente ejaculados com motilidade  $\geq 80\%$ , vigor espermático  $\geq 4$  e anormalidades morfológicas  $\leq 10\%$  foram utilizados.

### **Criopreservação do sêmen**

Os ejaculados após colheita foram manipulados a 27° C e misturados formando “pool”, sendo em seguida diluídos nos tratamentos obtendo-se uma concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

O meio diluidor utilizado foi à base de Tris (Dilutris®-SEMENCOM, Brasil) + 20% de gema de ovo (MB). Os tratamentos com CLA (Luta-CLA®-BASF, Brasil), devido à apresentação oleosa, foram preparados a partir do MB com adição de 1% de lauril sulfato de sódio, sendo denominado MBL. Os tratamentos foram compostos por: CP=MB, CN=MBL; T50=MBL+50µM CLA; T100=MBL+100µM CLA e T150=MBL+150µM CLA.

Após envasadas, seladas e raqueadas, as palhetas médias (0,5 mL) foram refrigeradas a 4° C por 4 horas, sendo em seguida colocadas na posição horizontal em caixa de isopor com vapor de nitrogênio líquido (-120° C) permanecendo 20 minutos. Na sequência foram imersas em nitrogênio líquido (-196° C) e, posteriormente, armazenadas em botijão criogênico.

### **Avaliações do sêmen pós-criopreservação**

Para cada tratamento foram analisadas duas palhetas de sêmen, as quais foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, sendo o sêmen transferido das palhetas para um tubo cônico de 1,5 mL previamente aquecido em banho-maria seco à mesma temperatura, sendo mantido incubado a 37°C. A análise subjetiva da motilidade e vigor espermáticos foi realizada por meio de microscopia óptica e posteriormente realizadas as demais avaliações descritas a seguir.

### **Avaliação computadorizada da motilidade espermática**

Para a avaliação da motilidade espermática pelo sistema de análise computadorizado do sêmen (CASA) utilizou-se o aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (HTM-IVOS, Versão 12.3, Hamilton Thorne Research, Beverly,



Massachusetts, USA), sendo que para a análise do movimento espermático utilizou-se *Animal Motility*, previamente ajustado para a análise do sêmen bovino.

Para a análise foi utilizada a câmara de Makler (Couting Chamber Makler® 0.01 sq.mm 10 µm deep Sefi-Medical Instruments LTD.), na qual foi colocado 10 µL do sêmen diluído em meio TALP *sperm*, na concentração de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL, sendo selecionados 10 campos por amostra para a leitura e análise. As características analisadas foram motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade média da trajetória (VAP, µm/s), velocidade linear progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

#### **Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial.**

A integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial foram avaliadas pela associação das sondas fluorescentes iodeto de propídeo (PI) (28,707-5; Sigma, St Louis, MO, USA), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA) (FITC-PSA, L-0770, Sigma), iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (Molecular Probes, T-3168) e Hoechst 33342 (H-342) (H-1399; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) sendo utilizado o protocolo proposto por Celeghini et al. (2007). A leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (Nikon, Eclipse 80i, Melville, NY, USA) em filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm), com aumento de 1.000 x.

As células foram classificadas em oito categorias, de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, sendo realizada a contagem de 200 células por amostra (Quadro 1) e os padrões de coloração podem ser visualizados na figura 1.

Quadro 1 - Classificação das células em categorias de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, detectadas pelas sondas PI, FITC-PSA, JC-1 e H342 (CELEGHINI et al., 2007).

<b>Ordem</b>	<b>Categoria</b>	<b>Sigla</b>
1	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Intacto e Com Função Mitocondrial	PIAIC
2	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Intacto e Sem Função Mitocondrial	PIAIS
3	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Lesado e Com Função Mitocondrial	PIALC

4	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Lesado e Sem Função Mitocondrial	PIALS
5	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Intacto e Com Função Mitocondrial	PLAIC
6	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Intacto e Sem Função Mitocondrial	PLAIS
7	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Lesado e Com Função Mitocondrial	PLALC
8	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Lesado e Sem Função Mitocondrial	PLALS

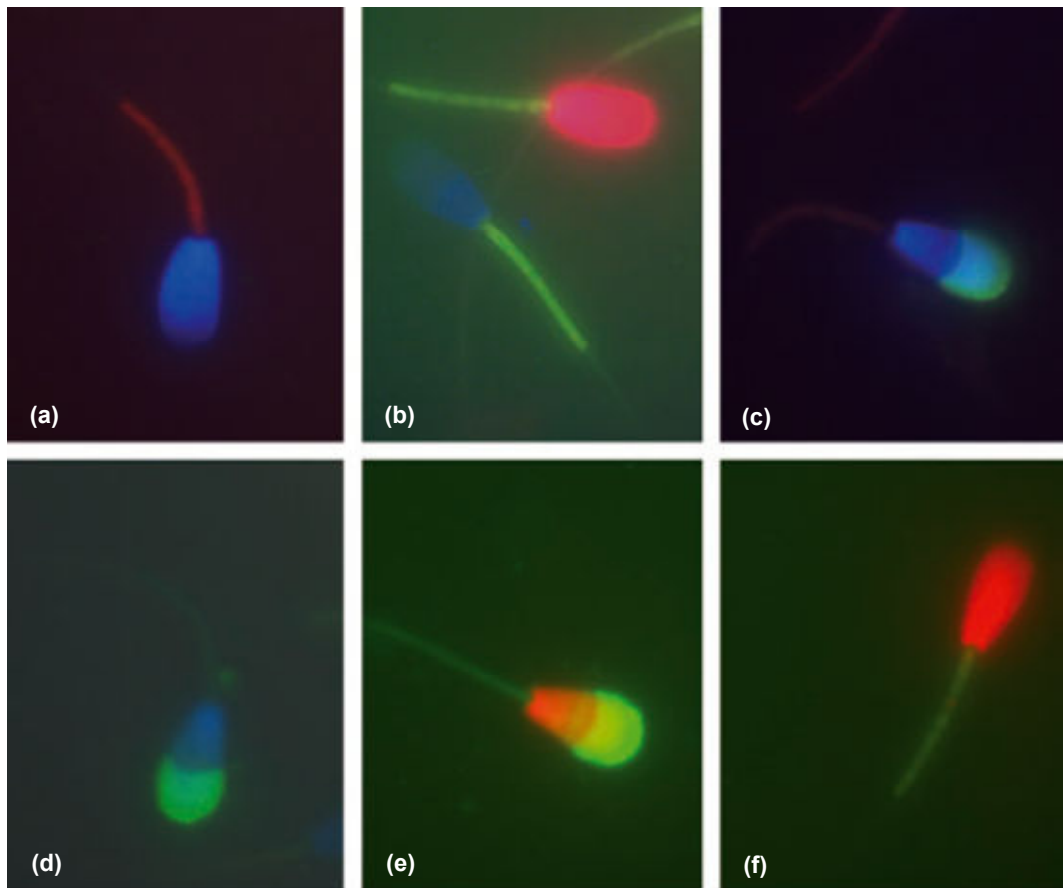


Figura 1 - Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, H342, FITC-PSA e JC-1 (aumento 1.000 x). **A.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto, com alto potencial de membrana mitocondrial. **B.** Superior = célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, com baixo potencial de membrana mitocondrial, Inferior = célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto, com baixo potencial de membrana mitocondrial. **C.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado, com alto potencial de membrana mitocondrial. **D.** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado, com baixo potencial de membrana mitocondrial. **E.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado, com baixo potencial de membrana mitocondrial. **F.** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto, com baixo potencial de membrana mitocondrial (CELEGHINI et al., 2007).

Após a detecção das oito categorias de células, a soma das porcentagens de células foi reclassificada em membrana plasmática intacta (MPI)

(PIAIC+PIAIS+PIALC+PIALS), acrossomo intacto (AI) (PIAIC, PIAIS, PLAIS), células com alto potencial mitocondrial (APM) (PIAIC, PIALC, PLAIC e PLALC). Adicionalmente a categoria de células PIAIC também foi selecionada para análise estatística pois, para que ocorra a fertilização, todas as estruturas do espermatozoide devem estar intactas

### Análise estatística

O experimento foi disposto em delineamento em blocos ao acaso, com 5 tratamentos (CP, CN, T50, T100 e T150) e quatro dias de colheitas. Os dados gerados foram avaliados pela análise de variância e posterior comparação de médias pelo teste Least Significant Difference (LSD) de Fisher, adotando nível de significância a 5%.

## RESULTADOS

### Avaliação subjetiva da motilidade e vigor espermático

A criopreservação do sêmen afetou a motilidade espermática subjetiva (MES) estimada visualmente, pois esta foi significativamente maior ( $P < 0,001$ ) no sêmen fresco ( $85\% \pm 0,00$ ) do que na pós-descongelação em todos os tratamentos (CP =  $42,50 \pm 4,33$ , CN =  $46,25 \pm 1,25$ , T50 =  $48,75 \pm 1,25$ , T100 =  $48,75 \pm 1,25$  e T150 =  $48,75 \pm 3,15\%$ ), porém não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos após a descongelação, como visualizado na Figura 2.

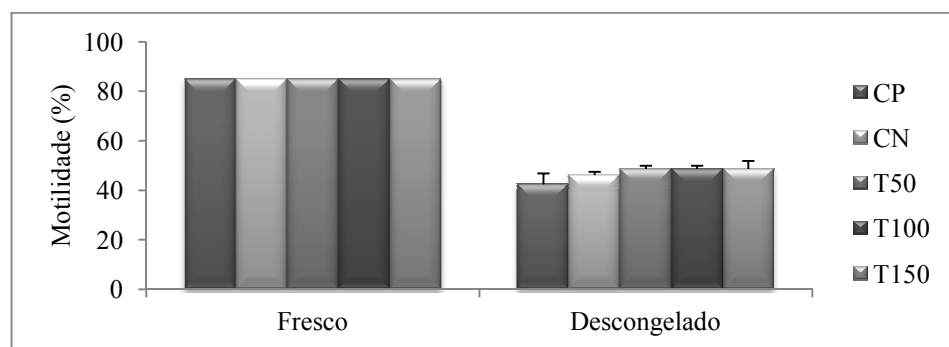


Figura 2 - Motilidade espermática subjetiva (MES) (média  $\pm$  erro padrão da média) estimada no sêmen fresco e criopreservado de bovino nos tratamentos Controle Positivo (CP), Controle Negativo (CN), Tratamento 50 (T50), Tratamento 100 (T100) e Tratamento 150 (T150).

O vigor espermático subjetivo (VES) do sêmen descongelado demonstrou que 100% das avaliações foram consideradas com vigor 3 no T100 equivalendo-se com o CP e podem ser visualizados na Figura 3.

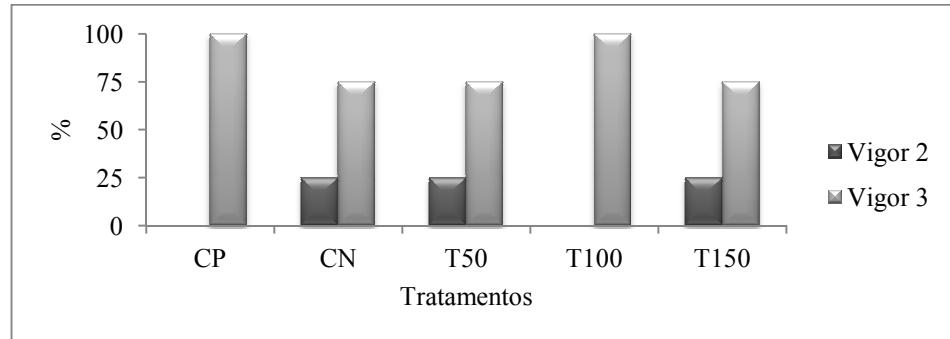


Figura 3 - Vigor espermático subjetivo (VES) no sêmen criopreservado de bovino nos tratamentos Controle Positivo (CP), Controle Negativo (CN), Tratamento 50 (T50), Tratamento 100 (T100) e Tratamento 150 (T150).

#### Avaliação computadorizada da motilidade espermática

A motilidade total (MT) e a motilidade progressiva (MP) do sêmen pós-descongelamento nos diferentes tratamentos pode ser observada na Figura 3. A motilidade total e progressiva nos tratamentos foi: CP = 65,00  $\pm$  8,28 e 54,00  $\pm$  6,61; CN = 63,50  $\pm$  2,90 e 49,25  $\pm$  3,15; T50 = 62,25  $\pm$  4,33 e 52,00  $\pm$  3,11; T100 = 70,00  $\pm$  3,74 e 59,50  $\pm$  3,12 e T150 = 62,75  $\pm$  6,34 e 52,00  $\pm$  5,21%, não sendo observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos.

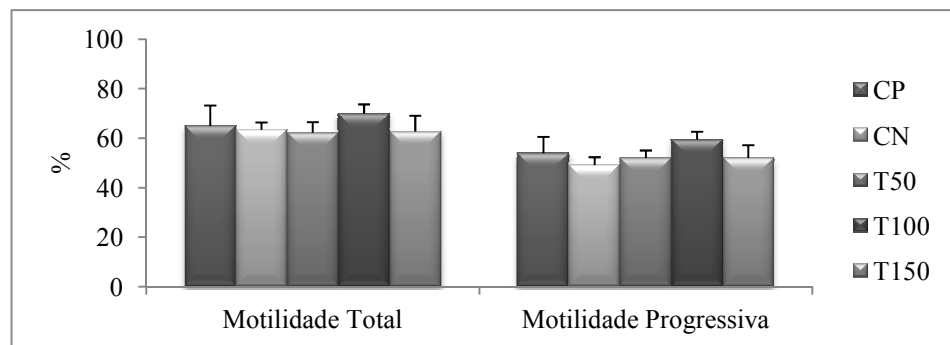


Figura 4 - Motilidade Total (MT) e Motilidade Progressiva (MP) (média  $\pm$  erro padrão da média) estimadas pelo sistema computadorizado de análise para o sêmen criopreservado de bovino nos tratamentos Controle Positivo (CP), Controle Negativo (CN), Tratamento 50 (T50), Tratamento 100 (T100) e Tratamento 150 (T150).

As velocidades espermáticas após a descongelação foram avaliadas pelo sistema CASA, a velocidade média da trajetória (VAP), a velocidade linear progressiva (VSL) e a velocidade curvilinear (VCL).

Na figura 5 podemos observar as três velocidades nos respectivos tratamentos, sendo que a VAP apresentou os seguintes valores: CP =  $96,48 \pm 5,10$ ; CN =  $94,45 \pm 3,03$ ; T50 =  $102,25 \pm 4,41$ ; T100 =  $93,95 \pm 2,89$  e T150 =  $97,80 \pm 1,46$   $\mu\text{m/s}$ . A VSL, obtida pelo sistema CASA demonstrou os valores nos tratamentos CP =  $78,35 \pm 4,55$ ; CN =  $79,38 \pm 3,05$ ; T50 =  $86,23 \pm 4,35$ ; T100 =  $78,85 \pm 3,05$  e T150 =  $80,13 \pm 1,11$   $\mu\text{m/s}$ . Já a VCL, registrada nos tratamentos foram CP =  $164,25 \pm 9,51$ ; CN =  $157,75 \pm 3,74$ ; T50 =  $171,05 \pm 8,71$ ; T100 =  $157,03 \pm 4,35$  e T150 =  $167,30 \pm 4,66$   $\mu\text{m/s}$ . Nas três velocidades avaliadas pelo sistema CASA não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

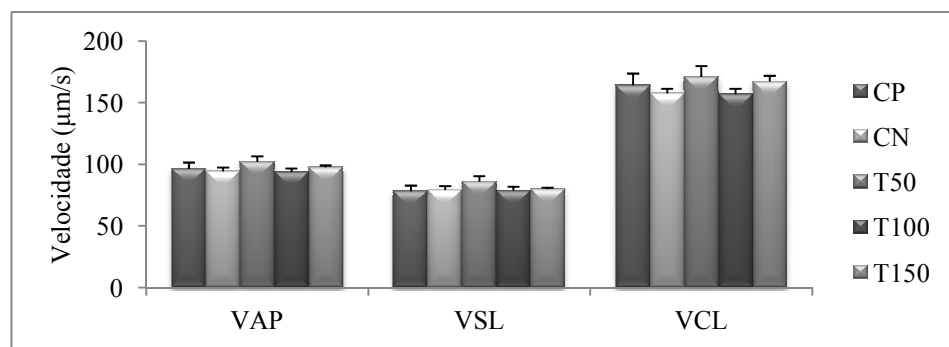


Figura 5 - Velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade curvilinear (VCL) (média  $\pm$  erro padrão da média) estimadas pelo sistema computadorizado de análise para o sêmen criopreservado de bovino nos tratamentos Controle Positivo (CP), Controle Negativo (CN), Tratamento 50 (T50), Tratamento 100 (T100) e Tratamento 150 (T150).

O deslocamento lateral de cabeça (ALH), medido em  $\mu\text{m}$  e apresentado na figura 6, observado nos tratamentos foram CP =  $7,15 \pm 0,29$ ; CN =  $6,75 \pm 0,09$ ; T50 =  $6,83 \pm 0,17$ ; T100 =  $6,53 \pm 0,17$  e T150 =  $7,00 \pm 0,27$   $\mu\text{m}$ . A análise estatística dos dados demonstrou que não ocorreram diferenças estatísticas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

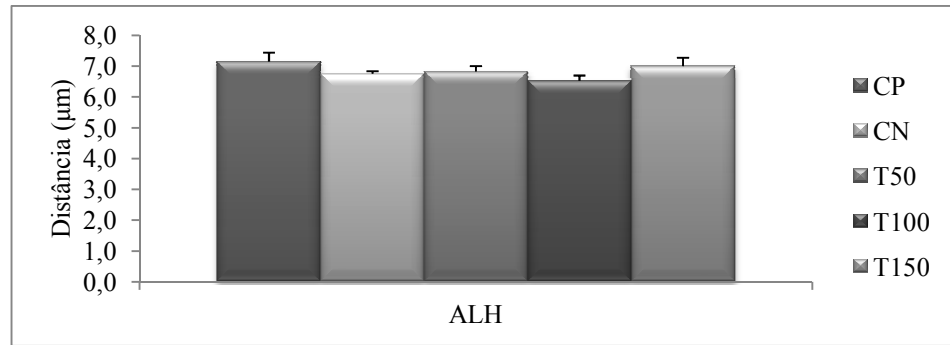


Figura 6 - Deslocamento lateral de cabeça (ALH) (média  $\pm$  erro padrão da média) estimada pelo sistema computadorizado de análise para o sêmen criopreservado de bovino nos tratamentos Controle Positivo (CP), Controle Negativo (CN), Tratamento 50 (T50), Tratamento 100 (T100) e Tratamento 150 (T150).

A frequência de batimento (BCF), figura 7, não apresentou diferença estatística entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ), sendo que os valores obtidos foram CP =  $30,03 \pm 1,50$ ; CN =  $31,40 \pm 1,67$ ; T50 =  $33,75 \pm 1,45$ ; T100 =  $31,38 \pm 1,03$  e T150 =  $30,55 \pm 1,93$  Hz.

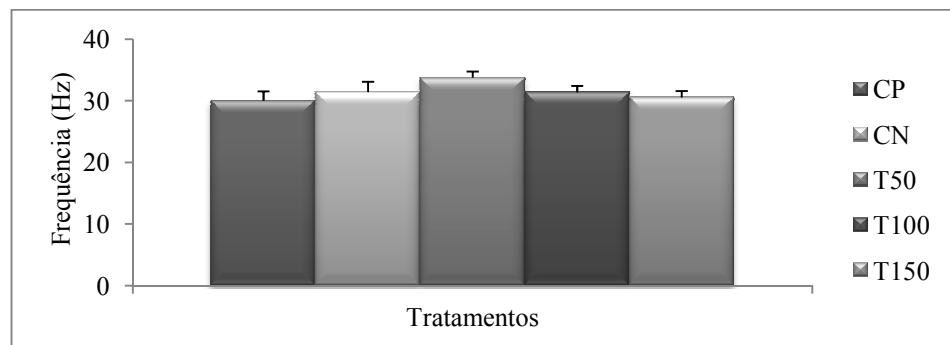


Figura 7 – Frequência de batimento (BCF) (média  $\pm$  erro padrão da média) estimada pelo sistema computadorizado de análise para o sêmen criopreservado de bovino nos tratamentos Controle Positivo (CP), Controle Negativo (CN), Tratamento 50 (T50), Tratamento 100 (T100) e Tratamento 150 (T150).

A retilinearidade (STR) dos espermatozoides pode ser observada na figura 8, sendo que os resultados nos tratamentos foram CP =  $81,50 \pm 0,87$ ; CN =  $84,00 \pm 1,15$ ; T50 =  $84,25 \pm 0,48$ ; T100 =  $84,25 \pm 0,63$  e T150 =  $82,75 \pm 1,70\%$ , não sendo observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Na linearidade (LIN) dos espermatozoides, figura 8, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ), sendo que os resultados obtidos foram os seguintes: CP =  $51,00 \pm 0,91$ ; CN =  $53,25 \pm 0,85$ ; T50 =  $53,25 \pm 0,25$ ; T100 =  $53,50 \pm 0,96$  e T150 =  $50,75 \pm 1,65\%$ .

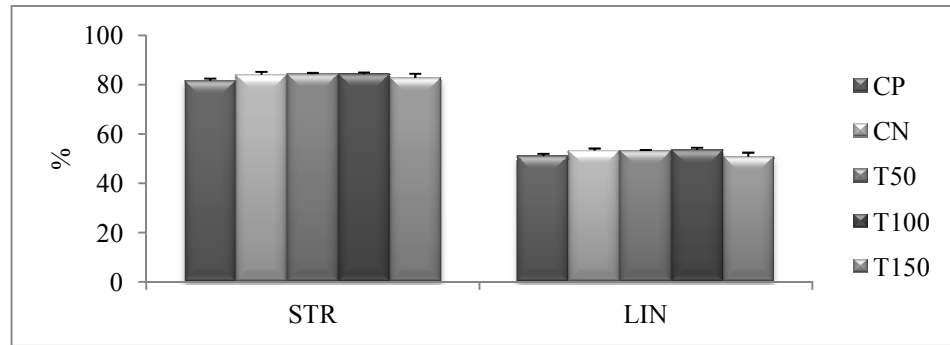


Figura 8 – Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN) (média  $\pm$  erro padrão da média) estimadas pelo sistema computadorizado de análise para o sêmen criopreservado de bovino nos tratamentos Controle Positivo (CP), Controle Negativo (CN), Tratamento 50 (T50), Tratamento 100 (T100) e Tratamento 150 (T150).

### **Integridade das membranas plasmática e acrossomal e função função mitocondrial**

Os percentuais de MPI, AI e APM detectados pela associação de sondas fluorescentes são apresentados na figura 9.

Os valores percentuais obtidos nos diferentes tratamentos para MPI foram CP =  $47,25 \pm 1,81$ ; CN =  $47,50 \pm 3,40$ ; T50 =  $43,25 \pm 6,20$ ; T100 =  $51,50 \pm 3,81$  e T150 =  $43,75 \pm 9,54\%$ . A análise estatística dos dados evidenciou que não ocorreu diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos.

Os valores de AI observado nos tratamentos CP =  $83,25 \pm 4,33$ ; CN =  $83,25 \pm 3,74$ ; T50 =  $81,38 \pm 2,08$ ; T100 =  $82,63 \pm 3,07$  e T150 =  $82,38 \pm 7,00\%$  demonstraram que, quando analisados estatisticamente ( $P > 0,05$ ), não diferiram entre si.

As porcentagens de espermatozoides APM nos tratamentos CP =  $33,13 \pm 6,76$ ; CN =  $24,75 \pm 6,30$ ; T50 =  $23,88 \pm 5,28$ ; T100 =  $27,50 \pm 3,35$  e T150 =  $13,38 \pm 3,58\%$ , ao serem analisadas estatisticamente evidenciaram a não ocorrência de diferenças estatísticas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos.

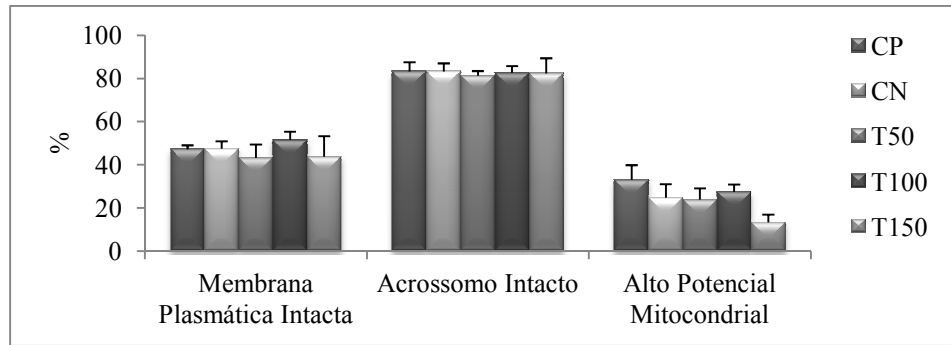


Figura 9 – Porcentagem (média  $\pm$  erro padrão da média) de espermatozoides criopreservados de bovinos nos tratamentos Controle Positivo (CP), Controle Negativo (CN), Tratamento 50 (T50), Tratamento 100 (T100) e Tratamento 150 (T150) com membrana plasmática intacta (MPI), acrossomo intacto (AI) e alto potencial mitocondrial.

Na figura 10 são apresentados os efeitos da criopreservação nos diferentes tratamentos sobre a categoria de células que apresentou a membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial (PIAIC).

Os valores observados nos tratamentos CP = 25,38  $\pm$  5,60; CN = 22,00  $\pm$  5,03; T50 = 21,75  $\pm$  5,44; T100 = 25,38  $\pm$  3,16 e T150 = 12,50  $\pm$  3,68% não diferiram estatisticamente ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos.

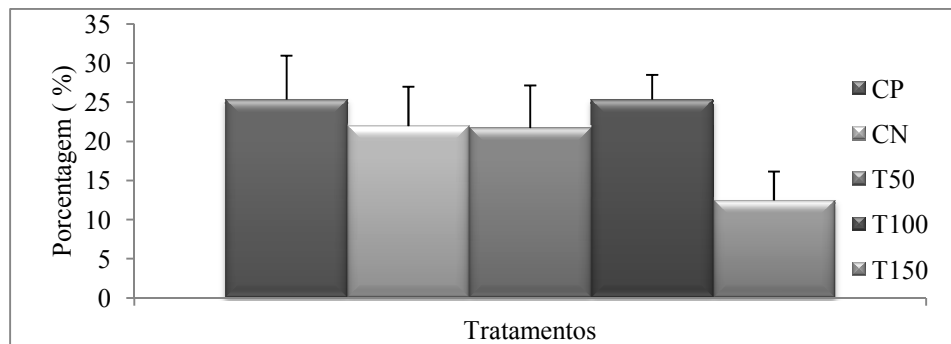


Figura 10 - Porcentagem (média  $\pm$  erro padrão da média) de espermatozoides criopreservados de bovinos nos tratamentos Controle Positivo (CP), Controle Negativo (CN), Tratamento 50 (T50), Tratamento 100 (T100) e Tratamento 150 (T150) com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e função mitocondrial (PIAIC).

## DISCUSSÃO

Neste trabalho, diversos parâmetros de espermatozoides bovinos congelados na presença de CLA foram avaliados. A motilidade espermática óptica não apresentou diferenças entre os tratamentos após o descongelamento, sugerindo que a presença de



CLA não apresenta efeitos deletérios sobre este parâmetro de espermatozoides criopreservados de touros. Embora o efeito de ácidos graxos durante o congelamento de espermatozoides não tenha sido descrito anteriormente, Hossain et al. (2007) observaram um aumento na motilidade de espermatozoides de suínos após a adição de ácido oleico, linoleico e araquidônico ao meio de diluição.

Marei et al. (2009) observaram que a alta concentração de ácido linoleico diminuiu a taxa de maturação de oócitos e resultou em elevada maturação nuclear anormal, indicando sua potencial toxicidade. A toxicidade do CLA não pode ser visualizada no vigor espermático, o qual demonstrou uma tendência à superioridade do T100 quando comparada com os demais tratamentos com CLA.

A avaliação da motilidade total e progressiva demonstrou não haver diferenças entre os tratamentos, porém com uma tendência à superioridade do T100 em relação aos demais.

A VAP, VSL e VCL também não diferiram estatisticamente, porém foi verificada a tendência à superioridade do T50. Segundo Verstegen et al. (2002), valores maiores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fecundados.

Mortimer (2000) e Verstegen et al. (2002) observaram que amostras com elevados parâmetros de velocidades e de LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco genital. O tratamento T50 demonstrou uma tendência à superioridade no BCF, o que não foi confirmado na LIN.

A avaliação dos tratamentos demonstrou que não ocorreu diferença na VAP, LIN e no ALH, que se mantiveram acima de  $93,95\mu\text{m/s}$ ,  $50,75\%$  e  $6,53\mu\text{m}$ , respectivamente, contudo pode ser observada uma tendência de melhor desempenho do T50 na VAP. Segundo Cox et al. (2006), os espermatozoides caprinos com velocidade eficiente na migração do muco cervical *in vitro* apresentam  $\text{LIN} > 50\%$  e  $\text{ALH} = 4,8\mu\text{m}$ . Espermatozoides humanos com boa capacidade de penetração no muco cervical apresentam  $\text{VAP} = 25\mu\text{m/s}$  e  $\text{ALH} = 4,5\mu\text{m}$  (Mortimer, 2000).

A hiperativação é sinal de que o espermatozoide atingiu o estágio de capacitação e esta mudança envolve, principalmente, o aumento da velocidade curvilínea (VCL), da amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) e diminuição da linearidade (LIN) (JANUSKAUSKAS et al., 1999). Essa tendência de aumento da VCL no T50 e T150, do ALH no T50 e T150 e a diminuição da LIN no T150 sugerindo a hiperativação, principalmente do T150.

A avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal e do potencial mitocondrial demonstrou não ocorrer diferença entre os tratamentos, porém a tendência à maior porcentagem de células com MPI e APM, conjuntamente com espermatozoides PIAIC, foi observada no T100. A manutenção do potencial de fecundação do espermatozoide depende da integridade e funcionalidade da membrana plasmática, do acrossomo e a manutenção de suas enzimas e do potencial de membrana mitocondrial, responsável pela produção de ATP, indispensável para o batimento flagelar e motilidade (ÕURA e TOSHIMORI, 1990; PARKS e GRAHAM, 1992; FLESCH e GADELLA, 2000).

### **Conclusões**

A adição dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10,*cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA), nas concentrações utilizadas, não causou alterações significativas sobre a integridade e funcionalidade dos espermatozoides bovinos submetidos à criopreservação.

### **Agradecimentos**

À Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina - CIDASC, Central de Inseminação Artificial, pela disponibilização dos touros e utilização dos equipamentos e instalações.

Ao Laboratório de Biotecnologias do Sêmen e Andrologia do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, *Campus* Administrativo de Pirassununga, pela cedência de laboratório e equipamentos para a realização das técnicas pós-descongelamento.

### **Referências bibliográficas**

Amarù, D.L.; Field, C.J. Conjugated linoleic acid decreases mcf-7 human breast cancer cell growth and insulin-like growth factor-1 receptor levels. *Lipids*, v. 44 (5), p. 449-458, 2009.

**Celeghini, E.C.C; Arruda, R.P.; Andrade, A.F.C. et al.** Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 42, p. 479-488, 2007.

**Cox, J. F.; Alfaro, V.; Montenegro, V. et al.** Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriog.*, v.66, p. 860-867, 2006.

**Flesch, F.M.; Gadella, B.M.** Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta.* v. 1469 (3), p. 197-235, 2000.

**Hochi, S.; Kimura, K.; Hanada, A.** Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. *Theriog.* v. 52, p. 497-504, 1999.

**Hossain, M.D.S.; Tareq, K.M.A.; Hammano, K. et al.** Effect of fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction. *Repr. Med. e Biol.*, v. 6, p. 235, 2007.

**Januskauskas, A.; Gil, J.; Söderquist, L. et al.** 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. *Theriog.* v. 52, p. 641-658, 1999.

**Marei, W.F.; Wathes, D.C.; Fouladi-Nashta, A.A.** The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. *Biol. of Repr.*, v. 81, p. 1064-1072, 2009.

**Mortimer, ST.** Casa- Practical aspects. *J Androl*, p.515-524, 2000.

**Óura, C.; Toshimori, K.** Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *Int. Rev. Cytol.*, v. 122, p. 105-151, 1990.

**Pariza, M.W.** Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *Am J Clin Nutr.* v.79 (6), p. 1132-1136, 2004.

**Parks, J.E.; Graham, J.K.** Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriog.* v. 38, p. 209-222, 1992.

**Pérez-Pé, R.; Cebrian-Pérez, J.A.; Muño-Blanco, T.** Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriog.* v.56, p.425-434, 2001.

**Ringseis, R.; Wen, G.; Saal, D.; Eder, K.** Conjugated linoleic acid isomers reduce cholesterol accumulation in acetylated LDL-induced mouse RAW264.7 macrophage-derived foam cells. *Lipids.* v. 43 (10), p. 913-923, 2008.

**Sampath, H.; Ntambi, J.M.** Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr.*; v. 25, p. 317-340, 2005.

**Subbaiah, P.V.; Gould, I.G.; Lal, S. et al.** Incorporation profiles of conjugated linoleic acid isomers in cell membranes and their positional distribution in phospholipids. *Bioch. et Bioph Acta*, v. 1811, p. 17-24, 2011.

**Takahashi, T.; Itoh, R.; Nishinomiya, H.; et al.** Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 47, p. 92-97, 2012.

**Tominaga, K.; Hamada, Y.; Yabuue, T. et al.** Effect of Linoleic Acid-Albumin on Post-Thaw Survival of *in vitro*-Produced Bovine Embryos at the 16-Cell Stage. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 62 (4), p. 465-467, 2000.

**Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Therio*, v. 57, p. 149-179, 2002.

**Wahle, K.W.J.; Heys, S.D.; Rotondo, D.** Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog. Lip. Res.* v. 43, p.553-587, 2004.

**Zhao G.; Subbaiah, P. V.; Mintzer, E. et al.** Molecular dynamic simulation study of cholesterol and conjugated double bonds in lipid bilayers. *Chem Phys Lipids.* v.164, p.811-818, 2011a.

**Zhao, G.; Subbaiah, P.V.; Chiu, S.W. et al.** Conjugated Double Bonds in Lipid Bilayers: A Molecular Dynamic Simulation Study. *Chem Phys Lipids.* v.164, p.251-257, 2011b.

#### 4. ARTIGO CIENTÍFICO 2

### INFLUENCIA DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CIS-9, TRANS-11 E TRANS-10, CIS-12) SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE DIFERENTES TOUROS

Marcio Pereira Soares<sup>1</sup>, Adriano Brandelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS.

#### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of the addition of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) on the freezing medium on sperm motility, plasma membrane integrity, acrosomal and mitochondrial sperm from different bulls. The ejaculates were collected from four Jersey bulls and processed individually. The extender used was based Tris (Dilutris<sup>®</sup>-SEMENCOM, Brazil) - 20% yolk egg (MB). The treatments with CLA (Luta-CLA<sup>®</sup>-BASF, Brazil), wich had oily presentation, were prepared from MB with addition of 1% sodium lauryl sulfate (MPL). The treatments consisted of CN = MB, CP = MBL, T50 = MBL+50 $\mu$ M CLA; T100 = MBL+100 $\mu$ M CLA and T150 = MBL+150  $\mu$ M CLA. After thawing, semen characteristics were analyzed by computerized analysis system (CASA) and plasma membrane integrity and acrosomal and mitochondrial function assessed by the association of the probes PI, FITC-PSA, JC-1 and H-342. No differences were observed between treatments, but different responses were observed among individuals. Different concentrations of the isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA), used in medium diluent for freezing bull semen, showed no effect on membrane integrity and functionality of spermatozoa of bulls submitted to cryopreservation. However, there were differences between individuals.

Keywords: bull semen cryopreservation, fatty acids, conjugated linoleic acid (CLA).

#### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA) no meio de congelamento sobre a motilidade espermática, a integridade da membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial de espermatozoides de diferentes touros. Os ejaculados foram colheitados de 4 touros Jersey e processados individualmente. O diluidor utilizado foi à base de Tris (Dilutris<sup>®</sup>-SEMENCOM, Brasil) + 20 % de gema de ovo (MB). Os tratamentos com CLA (Luta-CLA<sup>®</sup>-BASF, Brasil), que tinha apresentação oleosa, foram preparados a partir do MB com adição de 1% de lauril sulfato de sódio (MBL). Os tratamentos foram compostos por: CN=MB e CP=MBL; T50=MBL+50 $\mu$ M CLA; T100=MBL+100 $\mu$ M CLA e T150=MBL+150 $\mu$ M CLA. Após o descongelamento as características do semen foram analisadas pelo sistema de análise computadorizada (CASA) e a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial avaliadas pela associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA, JC-1 e H-342. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, porém foram verificadas diferentes respostas entre indivíduos. As diferentes concentrações dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA), utilizadas no meio diluidor para congelamento de sêmen de touro, não apresentaram efeito sobre a integridade de membranas e funcionalidade dos espermatozoides de touros submetidos à criopreservação, porém houve diferenças entre indivíduos.

Palavras-chave: touro, sêmen, criopreservação, ácidos graxos, ácido linoleico conjugado (CLA).

## INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos da membrana plasmática são importantes na manutenção da sua fluidez, fator determinante para a fertilidade espermática, especialmente para espermatozoides criopreservados (CEROLINI et al., 2003; WATERHOUSE et al., 2006).

As modificações na fluidez da membrana plasmática exercem uma influência significativa nas funções da membrana (STUBBS e SMITH, 1984), sendo influenciada pelo grau de saturação dos ácidos graxos ligados aos fosfolipídeos, o que determina a sua maior ou menor sensibilidade ao frio (PARKS e GRAHAM, 1992), que por sua vez

permite classificar os indivíduos como produtores de sêmen de alta e baixa congelabilidade, dependendo das características estruturais da membrana, o que é geneticamente determinado, predispondo à sobrevivência ao estresse da criopreservação (WATSON, 2000).

Com o objetivo de minimizar os efeitos do frio sobre os espermatozoides os ácidos graxos passaram a ser utilizados nos meios de refrigeração e criopreservação em diversas espécies. Pérez-Pé et al. (2001) adicionaram ácido oleico-linoleico ao meio de congelação de sêmen ovino e descrevem o efeito benéfico na preservação da viabilidade espermática sobre o pool de ejaculados de carneiros. Hossain et al. (2007) incubaram espermatozoides suínos, por 4 horas a 37°C, em meio de diluição com ácido oleico e linoleico observando melhora na motilidade e viabilidade espermáticas, porém apresentaram os resultados agrupados o que não permitiu visualização da diferença entre indivíduos. Kaeoket et al. (2010) incluíram ácido docosahexaenoico (DHA) ao diluidor de sêmen suíno e obtiveram maiores taxas de motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática e observaram diferenças entre raças na criotolerância espermática. Nasiri et al. (2012) adicionaram ácidos graxos polinsaturados (PUFA) da família ômega-3 ao diluidor de sêmen bovino e observaram melhora na qualidade espermática após o descongelamento, possivelmente devido à incorporação efetiva dos PUFA, especialmente do DHA, no período de resfriamento e com isso protegendo a membrana celular. No entanto mesmo com os efeitos positivos dos PUFA têm-se apenas os resultados sobre os espermatozoides bovinos e não o efeito sobre o ejaculado de cada touro. O efeito individual do uso de ácido linoleico no meio de diluição é descrito por Takahashi et al. (2012) que o observaram melhora na motilidade dos espermatozoides descongelados em um touro que apresentava baixa congelabilidade espermática.

Pereira et al. (2007, 2008) descrevem os resultados da adição de isômeros *trans-10*, *cis-12* do ácido linoleico conjugado (CLA) ao meio de cultivo embrionário e demonstraram aumento na criotolerância de embriões bovinos, porém Darwich et al. (2010) avaliaram os mesmos isômeros na criotolerância de embriões da mesma espécie e não observaram aumento na sobrevivência embrionária após a criopreservação, entretanto os resultados da inclusão de isômeros do CLA ao meio de diluição e criopreservação de sêmen ainda não foram descritos.

Diante desse contexto realizou-se o estudo, cujo objetivo foi avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA) no meio de congelamento sobre a motilidade espermática, integridade da membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides de diferentes touros.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais e localização**

Foram utilizados quatro touros da raça Jersey, em idade reprodutiva e com fertilidade conhecida, utilizados na Central de Inseminação Artificial da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina - CIDASC (Indaial, Santa Catarina, Brasil). Os animais apresentavam condição corporal (escore  $\geq 4$ , escala 1 a 5), mantidos sob as mesmas condições ambientais e alimentares.

### **Colheita do sêmen**

Os ejaculados foram colheitados, usando vagina artificial, uma vez por semana durante quatro semanas. Após as colheitas as amostras de sêmen foram acondicionadas em banho-maria e manipuladas nos respectivos tratamentos a temperatura de 27° C. Somente foram utilizados ejaculados com motilidade  $\geq 80\%$ , vigor espermático  $\geq 4$  e anormalidades morfológicas  $\leq 10\%$ .

### **Preparação do sêmen, diluidor e tratamentos**

Após a análise os ejaculados foram diluídos nos tratamentos obtendo-se a concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O diluidor utilizado foi à base de Tris (Dilutris<sup>®</sup>-SEMENCOM, Brasil), adicionado de gema de ovo (20%), sendo denominado meio padrão (MB). Os tratamentos com CLA (Luta-CLA<sup>®</sup>-BASF, Brasil), devido a apresentação oleosa, foram preparados a partir do MB com adição de 1% de lauril sulfato de sódio (MBL). Os tratamentos foram compostos por: Controle Positivo (CP)=MB; Controle Negativo (CN)=MBL; Tratamento 50 (T50)=MBL+50 $\mu$ M CLA;



Tratamento T100 (T100)=MBL+100 $\mu$ M CLA; Tratamento 150 (T150)=MBL+150 $\mu$ M CLA.

### **Refrigeração e o processo de congelamento**

Após envasadas, seladas e raqueadas, as palhetas (0,5 mL) foram refrigeradas a 4° C por 4 horas, sendo em seguida colocadas na posição horizontal em caixa de isopor com vapor de nitrogênio líquido, permanecendo 20 minutos. Na sequência foram imersas em nitrogênio líquido (-196° C) e, posteriormente, armazenadas em botijão criogênico.

### **Avaliações do sêmen pós-criopreservação**

Para as avaliações foram descongeladas, em banho maria, duas palhetas por tratamento (37°C/30 segundos), sendo transferido o sêmen para um tubo cônico de polipropileno (37°C), homogeneizado e realizada a análise visual da motilidade espermática subjetiva (MES) por meio de microscopia óptica.

Para as demais avaliações foi realizada a diluição da amostra em meio TALP *Sperm* (BAVISTER, et al., 1983) obtendo a concentração de 25 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL e mantido incubado em banho-maria a 37°C.

### **Avaliação computadorizada da motilidade espermática**

As características analisadas foram motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade média da trajetória (VAP,  $\mu$ m/s), velocidade linear progressiva (VSL,  $\mu$ m/s), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu$ m), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

Para a avaliação da motilidade espermática pelo sistema de análise computadorizada do sêmen (CASA) (HTM-IVOS, V. 12.3, Hamilton Thorne Research, Beverly, USA), sendo utilizada a câmara de Makler (Counting Chamber Makler<sup>®</sup> 0.01 sq.mm 10  $\mu$ m deep Sefi-Medical Instruments LTD.), previamente aquecida, na qual foi

colocada 10  $\mu\text{L}$  do sêmen diluído em meio TALP *sperm*, na concentração de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL, sendo selecionados 10 campos por amostra para a leitura e análise.

#### **Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial.**

Uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  de sêmen diluído em meio TALP *Sperm* ( $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL) foi incubado em tubo de microcentrífuga por 8 minutos a  $37^\circ\text{C}$  com 3  $\mu\text{L}$  de iodeto de propídio (PI) (0,5 mg/mL) (28,707-5; Sigma, St Louis, MO, USA), 2  $\mu\text{L}$  de Hoechst 33342 (H-342) (40  $\mu\text{g/mL}$ ) (H-1399; Molecular Probes, Eugene, OR, USA), 6  $\mu\text{L}$  de iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (153  $\mu\text{M}$ ) (Molecular Probes, T-3168) e 50  $\mu\text{L}$  de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA) (100  $\mu\text{g/mL}$ ) (FITC-PSA, L-0770, Sigma).

A avaliação da fluorescência e a classificação das células espermáticas foi realizada pelo protocolo de Celeghini et al. (2007), sendo que após a detecção das oito categorias de células, a soma das porcentagens das células foram reclassificada em membrana plasmática intacta (MPI), acrossomo intacto (AI), células com alto potencial mitocondrial (APM) e células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial (PIAIC).

#### **Análise estatística**

O experimento foi disposto em um delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se 4 touros, 5 tratamentos (CN, CP, T50, T100 e T150) e quatro colheitas. Os dados das variáveis obtidas dos diferentes tratamentos e touros foram submetidos à análise de variância e posterior comparação de médias pelo teste Least Significant Difference (LSD) de Fisher, adotando nível de significância a 5%.

## **RESULTADOS**

#### **Avaliação subjetiva da motilidade**

A Tab. 1 apresenta os valores para MES no sêmen descongelado. A análise estatística demonstrou não haver diferença entre os tratamentos. Na comparação dos touros no tratamento CP foi observada melhor motilidade no A1, quando comparado

com o A2; no T50 o melhor resultado foi no A1 e A4 em relação ao A2; já no T100 o A1 e A4 foram superiores ao A3 e A4; e no T150 o A2 foi inferior aos demais.

Tabela 1 - Motilidade espermática subjetiva do sêmen descongelado de diferentes touros avaliados pelo sistema de análise computadorizada de sêmen.

Touros	Média ± EPM, %				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	51,25 ± 2,39 <sup>Aa</sup>	52,50 ± 4,79 <sup>Aa</sup>	52,50 ± 2,50 <sup>Aa</sup>	56,25 ± 2,39 <sup>Aa</sup>	50,00 ± 3,54 <sup>Aa</sup>
A2	36,25 ± 3,75 <sup>Ab</sup>	37,50 ± 7,50 <sup>Aa</sup>	35,00 ± 5,00 <sup>Ab</sup>	32,50 ± 2,50 <sup>Ab</sup>	33,33 ± 3,33 <sup>Ab</sup>
A3	38,75 ± 5,15 <sup>Aab</sup>	43,33 ± 6,67 <sup>Aa</sup>	38,75 ± 7,18 <sup>Aab</sup>	38,33 ± 6,01 <sup>Ab</sup>	47,50 ± 4,79 <sup>Aa</sup>
A4	42,50 ± 4,79 <sup>Aab</sup>	51,25 ± 6,57 <sup>Aa</sup>	52,50 ± 4,79 <sup>Aa</sup>	52,50 ± 4,79 <sup>Aa</sup>	48,75 ± 4,27 <sup>Aa</sup>

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

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

CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50µM CLA; T100 = MBL+100µM CLA e T150 = MBL+150µM CLA.

EPM = erro padrão da média.

#### Avaliação computadorizada da motilidade espermática

Na Tab. 2 pode ser observada a motilidade total (MT) avaliada pelo CASA. A análise estatística demonstrou não haver diferenças entre os tratamentos (P>0,05). Na comparação entre touros no CP e T100 os melhores resultados foram observados nos A1 e A4 em relação ao A2.

Tabela 2 - Motilidade total do sêmen descongelado de diferentes touros avaliados pelo sistema de análise computadorizada de sêmen.

Touros	Média ± EPM, µm/s				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	65,50 ± 4,50 <sup>Aa</sup>	67,75 ± 7,98 <sup>Aa</sup>	66,25 ± 6,29 <sup>Aa</sup>	70,75 ± 1,25 <sup>Aa</sup>	71,00 ± 8,07 <sup>Aa</sup>
A2	42,50 ± 4,19 <sup>Ac</sup>	51,75 ± 11,43 <sup>Aa</sup>	55,00 ± 7,51 <sup>Aa</sup>	48,00 ± 1,41 <sup>Ac</sup>	51,00 ± 10,58 <sup>Aa</sup>
A3	49,75 ± 5,89 <sup>Abc</sup>	59,67 ± 8,69 <sup>Aa</sup>	58,25 ± 7,94 <sup>Aa</sup>	56,00 ± 9,29 <sup>Abc</sup>	60,75 ± 7,44 <sup>Aa</sup>
A4	57,00 ± 2,86 <sup>Aab</sup>	64,25 ± 6,73 <sup>Aa</sup>	72,50 ± 4,66 <sup>Aa</sup>	67,25 ± 4,50 <sup>Aab</sup>	63,25 ± 6,42 <sup>Aa</sup>

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

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

CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50 $\mu$ M CLA; T100 = MBL+100 $\mu$ M CLA e T150 = MBL+150 $\mu$ M CLA.  
EPM = erro padrão da média.

A motilidade progressiva (MP) avaliada pelo CASA pode ser observada na Tab. 3. Não foram observadas diferenças entre tratamentos. Na avaliação dos resultados dos touros no mesmo tratamento foram detectados no CP os melhores resultados nos A1 e A4, sendo que o A4 não diferiu do A3 e o A2 apresentou igualdade na comparação com o A3. No T100 o A1, A3 e A4 não apresentaram diferenças entre si, sendo observada a menor MP no A2 que não diferiu do A3.

Tabela 3 - Motilidade progressiva do sêmen descongelado de diferentes touros avaliados pelo sistema de análise computadorizada de sêmen.

Touros	Média $\pm$ EPM, $\mu$ m/s				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	51,25 $\pm$ 3,61 <sup>Aa</sup>	55,00 $\pm$ 7,15 <sup>Aa</sup>	49,50 $\pm$ 4,66 <sup>Aa</sup>	53,00 $\pm$ 1,08 <sup>Aa</sup>	54,00 $\pm$ 6,18 <sup>Aa</sup>
A2	33,50 $\pm$ 3,12 <sup>Ac</sup>	42,75 $\pm$ 10,40 <sup>Aa</sup>	44,00 $\pm$ 6,43 <sup>Aa</sup>	39,25 $\pm$ 0,85 <sup>Ab</sup>	42,33 $\pm$ 9,02 <sup>Aa</sup>
A3	39,25 $\pm$ 4,61 <sup>Abc</sup>	48,67 $\pm$ 8,25 <sup>Aa</sup>	46,75 $\pm$ 6,20 <sup>Aa</sup>	47,67 $\pm$ 8,37 <sup>Aab</sup>	50,50 $\pm$ 6,20 <sup>Aa</sup>
A4	46,75 $\pm$ 3,12 <sup>Aab</sup>	54,00 $\pm$ 6,23 <sup>Aa</sup>	61,00 $\pm$ 3,63 <sup>Aa</sup>	56,25 $\pm$ 2,95 <sup>Aa</sup>	52,00 $\pm$ 5,73 <sup>Aa</sup>

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

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

CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50 $\mu$ M CLA; T100 = MBL+100 $\mu$ M CLA e T150 = MBL+150 $\mu$ M CLA.

EPM = erro padrão da média.

A análise estatística dos dados de velocidade média da trajetória (VAP) (Tab. 4) demonstrou não haver diferenças tratamentos. Na comparação entre touros no CN as melhores velocidades foram observadas no A1 e A4, sendo que o A2 apresentou valor intermediário não diferindo do A4 e do A3 que apresentou menor VAP; no CP a melhor VAP foi observada no A1 e A4, sendo que o A4 apresentou valores intermediários; no T50, o melhor resultado foi observado no A1 e A4, sendo que o A1 obteve resultado intermediário; no T100 os A1, A3 e A4 não diferiram entre si e apresentaram melhores

resultados; já no T150 o A1, A2 e A4 tiveram melhores desempenhos, sendo que o A2 e A4 apresentaram valores intermediários.

Tabela 4 - Velocidade média da trajetória do sêmen descongelado de diferentes touros avaliados pelo sistema de análise computadorizada de sêmen.

Touros	Média ± EPM, µm/s				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	102,30 ± 0,94 <sup>Aa</sup>	99,80 ± 2,42 <sup>Aa</sup>	93,33 ± 5,48 <sup>Aab</sup>	100,45 ± 2,99 <sup>Aa</sup>	108,08 ± 5,95 <sup>Aa</sup>
A2	82,28 ± 6,14 <sup>Ab</sup>	89,28 ± 4,57 <sup>Abc</sup>	82,77 ± 2,48 <sup>Abc</sup>	75,55 ± 3,14 <sup>Ab</sup>	91,50 ± 5,52 <sup>Aab</sup>
A3	86,13 ± 4,67 <sup>Ab</sup>	80,50 ± 0,50 <sup>Ac</sup>	80,23 ± 1,09 <sup>Ac</sup>	89,03 ± 5,33 <sup>Aa</sup>	77,88 ± 8,10 <sup>Ab</sup>
A4	94,63 ± 5,23 <sup>Aab</sup>	91,28 ± 3,19 <sup>Aab</sup>	97,83 ± 4,10 <sup>Aa</sup>	97,73 ± 4,70 <sup>Aa</sup>	91,43 ± 3,83 <sup>Aab</sup>

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

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

CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50µM CLA; T100 = MBL+100µM CLA e T150 = MBL+150µM CLA.

EPM = erro padrão da média.

Os dados de velocidade linear progressiva (VSL) (Tab. 5) não apresentaram diferença entre tratamentos. Foram observadas diferenças entre os touros nos tratamentos CN onde o A1, A2 e A4 não diferiram e apresentaram melhores velocidades em relação ao A3, sendo que o A2 e A4 com valores intermediários; o melhor resultado no T50 foi observado no A4; no T100 os touros A1, A3 e A4 tiveram melhor VSL; já no T150 os A1, A3 e A4 não diferiram, sendo que a velocidade foi intermediária no A2 e A4.

Tabela 5 - Velocidade linear progressiva do sêmen descongelado de diferentes touros avaliados pelo sistema de análise computadorizada de sêmen.

Touros	Média ± EPM, µm/s				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	79,45 ± 1,32 <sup>Aa</sup>	78,05 ± 2,49 <sup>Aa</sup>	71,33 ± 3,74 <sup>Ab</sup>	76,95 ± 2,10 <sup>Aa</sup>	82,43 ± 4,21 <sup>Aa</sup>
A2	69,15 ± 4,50 <sup>Aa</sup>	73,40 ± 4,66 <sup>Aab</sup>	67,47 ± 2,79 <sup>Ab</sup>	64,85 ± 2,49 <sup>Ab</sup>	74,73 ± 4,29 <sup>Aab</sup>
A3	71,13 ± 3,39 <sup>Aa</sup>	67,27 ± 0,30 <sup>Ab</sup>	66,58 ± 1,37 <sup>Ab</sup>	74,90 ± 3,57 <sup>Aa</sup>	67,03 ± 6,24 <sup>Ab</sup>
A4	79,80 ± 4,26 <sup>Aa</sup>	77,58 ± 2,83 <sup>Aab</sup>	82,23 ± 3,35 <sup>Aa</sup>	83,43 ± 3,48 <sup>Aa</sup>	76,68 ± 3,05 <sup>Aab</sup>

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística na linha ( $P < 0,05$ ).  
 Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística na coluna ( $P < 0,05$ ).  
 CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50 $\mu$ M CLA;  
 T100 = MBL+100 $\mu$ M CLA e T150 = MBL+150 $\mu$ M CLA.  
 EPM = erro padrão da média.

Na Tab. 6 pode ser observada a velocidade curvilinear (VCL) avaliada pelo CASA. Não houve diferença entre os tratamentos. Na comparação entre touros no CN e T150 os melhores resultados são do A1; no CP a melhor velocidade foi do A1 e A4, sendo que o A4 apresentou valores intermediários; no T50, o A1 obteve o melhor resultado, seguido do A4, que não diferiu do A2, sendo que o A2 apresentou valor intermediário; já no T100, a melhor VCL foi observada no A1 e A4, sendo que o A4 não diferiu do A3 e o valor intermediário foi registrado no A3, quando comparado com o A2.

Tabela 6 - Velocidade curvilinear do sêmen descongelado de diferentes touros avaliados pelo sistema de análise computadorizada de sêmen.

Touros	Média $\pm$ EPM, $\mu$ m/s				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	182,30 $\pm$ 1,48 <sup>Aa</sup>	179,48 $\pm$ 6,53 <sup>Aa</sup>	165,33 $\pm$ 10,06 <sup>Aa</sup>	178,90 $\pm$ 7,36 <sup>Aa</sup>	194,15 $\pm$ 9,64 <sup>Aa</sup>
A2	134,90 $\pm$ 12,3 <sup>Ab</sup>	151,10 $\pm$ 8,06 <sup>Ab</sup>	139,93 $\pm$ 4,55 <sup>Abc</sup>	123,68 $\pm$ 6,63 <sup>Ac</sup>	156,07 $\pm$ 11,11 <sup>Ab</sup>
A3	150,60 $\pm$ 10,67 <sup>Ab</sup>	138,63 $\pm$ 1,96 <sup>Ab</sup>	138,00 $\pm$ 6,59 <sup>Ac</sup>	149,23 $\pm$ 7,31 <sup>Abc</sup>	124,40 $\pm$ 16,42 <sup>Ab</sup>
A4	160,03 $\pm$ 9,62 <sup>Aab</sup>	150,28 $\pm$ 6,13 <sup>Ab</sup>	162,60 $\pm$ 7,30 <sup>Ab</sup>	161,25 $\pm$ 9,61 <sup>Aab</sup>	151,90 $\pm$ 6,40 <sup>Ab</sup>

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística na linha ( $P < 0,05$ ).  
 Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística na coluna ( $P < 0,05$ ).  
 CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50 $\mu$ M CLA;  
 T100 = MBL+100 $\mu$ M CLA e T150 = MBL+150 $\mu$ M CLA.  
 EPM = erro padrão da média.

A amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) (Tab. 7) não apresentou diferença entre tratamentos. Na comparação entre touros no mesmo tratamento no CN e T150 o melhor desempenho foi do A1; no CP o A1, A3 e A4 não diferiram apresentaram o maior ALH, sendo que o A3 e A4 demonstraram valores intermediários; no T50 o A1 e A4 não diferiram apresentaram valores superiores, sendo que o A4 demonstrou valor intermediário; e no T100 o melhor resultado foi observado no A1.

Tabela 7 - Amplitude do deslocamento lateral de cabeça do sêmen descongelado de diferentes touros avaliados pelo sistema de análise computadorizada de sêmen.

Touros	Média ± EPM, µm/s				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	8,08 ± 0,10 <sup>Aa</sup>	7,85 ± 0,39 <sup>Aa</sup>	7,50 ± 0,30 <sup>Aa</sup>	7,95 ± 0,38 <sup>Aa</sup>	8,33 ± 0,27 <sup>Aa</sup>
A2	5,88 ± 0,53 <sup>Ab</sup>	6,40 ± 0,27 <sup>Ab</sup>	6,20 ± 0,26 <sup>Ab</sup>	5,38 ± 0,22 <sup>Ac</sup>	6,70 ± 0,50 <sup>Ab</sup>
A3	6,93 ± 0,61 <sup>Aab</sup>	6,13 ± 0,12 <sup>Ab</sup>	6,18 ± 0,36 <sup>Ab</sup>	6,23 ± 0,03 <sup>Abc</sup>	5,13 ± 0,76 <sup>Ab</sup>
A4	6,90 ± 0,32 <sup>Aab</sup>	6,48 ± 0,29 <sup>Ab</sup>	6,60 ± 0,28 <sup>Aab</sup>	6,55 ± 0,33 <sup>Ab</sup>	6,53 ± 0,22 <sup>Ab</sup>

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

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

CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50µM CLA; T100 = MBL+100µM CLA e T150 = MBL+150µM CLA.

EPM = erro padrão da média.

Na Tab. 8 são apresentadas as médias da frequência de batimento (BCF) sendo que não ocorreram diferenças entre os tratamentos. Na comparação entre os touros no mesmo tratamento foi observado que no T50 o A2, A3 e A4 não diferiram e apresentaram maior BCF, sendo que o A2 e A3 apresentaram valores intermediários.

Tabela 8 - Frequência de batimento do sêmen descongelado de diferentes touros avaliados pelo sistema de análise computadorizada de sêmen.

Touros	Média ± EPM, Hz				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	26,88 ± 0,56 <sup>Aa</sup>	27,10 ± 1,37 <sup>Aa</sup>	25,13 ± 0,86 <sup>Ab</sup>	27,03 ± 0,89 <sup>Aa</sup>	26,70 ± 1,34 <sup>Aa</sup>
A2	29,45 ± 2,38 <sup>Aa</sup>	29,00 ± 1,92 <sup>Aa</sup>	27,83 ± 1,79 <sup>Aab</sup>	30,45 ± 0,79 <sup>Aa</sup>	30,07 ± 2,05 <sup>Aa</sup>
A3	27,33 ± 1,96 <sup>Aa</sup>	28,57 ± 1,01 <sup>Aa</sup>	28,53 ± 0,61 <sup>Aab</sup>	26,30 ± 5,56 <sup>Aa</sup>	29,98 ± 3,29 <sup>Aa</sup>
A4	31,18 ± 1,55 <sup>Aa</sup>	30,90 ± 1,81 <sup>Aa</sup>	30,83 ± 1,62 <sup>Aa</sup>	32,78 ± 0,62 <sup>Aa</sup>	29,83 ± 1,21 <sup>Aa</sup>

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

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

CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50µM CLA; T100 = MBL+100µM CLA e T150 = MBL+150µM CLA.

EPM = erro padrão da média.

Na retilinearidade (STR) (Tab. 9) não houve diferenças entre tratamentos. A comparação entre touros no mesmo tratamento demonstrou que no CN o A4 apresentou maior STR; no CP o melhor resultado foi do A1; e no T50, T100 e T150 o melhor desempenho foi dos A2, A3 e A4.

Tabela 9 - Retilinearidade (STR) do sêmen descongelado de diferentes touros avaliados pelo sistema de análise computadorizada de sêmen.

Touros	Média ± EPM, %				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	78,50 ± 0,29 <sup>Aa</sup>	79,25 ± 2,02 <sup>Ab</sup>	77,75 ± 0,95 <sup>Ab</sup>	78,00 ± 0,71 <sup>Ab</sup>	77,00 ± 1,15 <sup>Ab</sup>
A2	85,50 ± 1,32 <sup>Ab</sup>	83,50 ± 1,50 <sup>Aab</sup>	82,33 ± 1,04 <sup>Aa</sup>	86,25 ± 0,85 <sup>Aa</sup>	83,00 ± 1,32 <sup>Aa</sup>
A3	82,75 ± 1,70 <sup>Ab</sup>	83,00 ± 0,00 <sup>Aab</sup>	83,50 ± 1,19 <sup>Aa</sup>	84,33 ± 1,04 <sup>Aa</sup>	86,75 ± 2,78 <sup>Aa</sup>
A4	84,00 ± 1,47 <sup>Ab</sup>	84,75 ± 0,85 <sup>Aa</sup>	84,25 ± 1,31 <sup>Aa</sup>	84,75 ± 1,25 <sup>Aa</sup>	83,75 ± 0,95 <sup>Aa</sup>

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

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

CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50µM CLA; T100 = MBL+100µM CLA e T150 = MBL+150µM CLA.

EPM = erro padrão da média.

A avaliação da linearidade (LIN) (Tab. 10) demonstrou não haver diferenças entre os tratamentos. Na comparação entre animais no mesmo tratamento foi observada que no CN os A2, A3 e A4 não diferiram e apresentaram os maiores valores, sendo que o A2 e A3 apresentaram resultados intermediários; no CP os A1, A2 e A4 tiveram maior LIN e não evidenciaram diferença, porém o A1 e A4 demonstram resultados intermediários; no T50 e T100 os A2, A3 e A4 foram iguais estatisticamente; já no T150 o A2, A3 e A4 não diferiram, sendo que A2 e A4 foram intermediários na LIN.

Tabela 10 - Linearidade do sêmen descongelado de diferentes touros avaliados pelo sistema de análise computadorizada de sêmen.

Touros	Média ± EPM, %				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	47,25 ± 1,03 <sup>Ab</sup>	47,25 ± 2,17 <sup>Ab</sup>	46,50 ± 1,04 <sup>Ab</sup>	47,00 ± 0,91 <sup>Ab</sup>	45,50 ± 1,04 <sup>Ab</sup>



A2	56,50 ±2,40 <sup>Aa</sup>	51,75 ±1,75 <sup>Aab</sup>	51,67 ±1,26 <sup>Aa</sup>	56,25 ±1,49 <sup>Aa</sup>	51,67 ±2,08 <sup>Aab</sup>
A3	50,50 ±1,71 <sup>Ab</sup>	50,33 ±0,76 <sup>Aab</sup>	51,50 ±1,66 <sup>Aa</sup>	54,33 ±0,58 <sup>Aa</sup>	57,00 ±4,02 <sup>Aa</sup>
A4	52,00 ±2,12 <sup>Aab</sup>	53,75 ±1,11 <sup>Aa</sup>	52,75 ±1,55 <sup>Aa</sup>	54,00 ±1,08 <sup>Aa</sup>	52,50 ±0,87 <sup>Aab</sup>

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

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

CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50µM CLA; T100 = MBL+100µM CLA e T150 = MBL+150µM CLA.

EPM = erro padrão da média.

### Integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial

As porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática intacta (MPI), acrossomo intacto (AI) e com função mitocondrial (CFM) e contendo membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e função mitocondrial (PIAIC) detectados pela associação de sondas fluorescentes são apresentadas nas Tab.s 11 a 14.

A avaliação dos dados demonstrou não haver diferença entre os tratamentos nas variáveis analisadas.

Na Tab. 11 podem ser observadas as porcentagens de MPI. A comparação entre touros no mesmo tratamento demonstrou que no CN o A1, A3 e A4 não diferiram, porém o A1 e A4 apresentaram valores intermediários.

Tabela 11 - Espermatozoides com membrana plasmática intacta (MPI) avaliada pela associação de sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência em sêmen descongelado de diferentes touros.

Touros	Média ± EPM, %				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	62,75 ±2,02 <sup>Aa</sup>	66,00 ±4,57 <sup>Aab</sup>	58,63 ±2,48 <sup>Aa</sup>	69,63 ±6,75 <sup>Aa</sup>	67,88 ±4,94 <sup>Aa</sup>
A2	54,63 ±18,12 <sup>Aa</sup>	45,25 ±15,48 <sup>Ab</sup>	63,17 ±7,44 <sup>Aa</sup>	63,50 ±4,25 <sup>Aa</sup>	74,83 ±3,02 <sup>Aa</sup>
A3	60,63 ±4,90 <sup>Aa</sup>	80,50 ±4,63 <sup>Aa</sup>	63,50 ±9,02 <sup>Aa</sup>	72,67 ±9,36 <sup>Aa</sup>	62,88 ±14,57 <sup>Aa</sup>
A4	72,25 ±4,28 <sup>Aa</sup>	63,13 ±7,87 <sup>Aab</sup>	67,13 ±10,02 <sup>Aa</sup>	70,50 ±9,54 <sup>Aa</sup>	54,00 ±14,43 <sup>Aa</sup>

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

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

CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50µM CLA; T100 = MBL+100µM CLA e T150 = MBL+150µM CLA.

EPM = erro padrão da média.

A porcentagem de espermatozoides com acrossomo intacto (AI) pode ser visualizada na Tab. 12.

Não foram observadas diferenças entre touros no mesmo tratamento. Na avaliação dos touros no mesmo tratamento foi observado um melhor desempenho do A1, A2 e A4, que não diferiram no T100; já no T150 os resultados indicam igualdade e superioridade dos A1, A3 e A4 em relação ao A2.

Tabela 12 - Espermatozoides com acrossomo intacto (AI) avaliados pela associação de sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência em sêmen descongelado de diferentes touros.

Touros	Média ± EPM, %				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	87,75 ±3,38 <sup>Aa</sup>	87,25 ±1,65 <sup>Aa</sup>	89,13 ±2,90 <sup>Aa</sup>	89,00 ±1,57 <sup>Aa</sup>	90,13 ±1,18 <sup>Aa</sup>
A2	82,88 ±5,07 <sup>Aa</sup>	77,25 ±4,53 <sup>Aa</sup>	81,33 ±2,90 <sup>Aa</sup>	83,88 ±3,72 <sup>Aa</sup>	73,67 ±2,52 <sup>Ab</sup>
A3	81,75 ±7,85 <sup>Aa</sup>	87,00 ±5,25 <sup>Aa</sup>	85,13 ±7,12 <sup>Aa</sup>	73,17 ±2,27 <sup>Ab</sup>	86,38 ±4,24 <sup>Aa</sup>
A4	73,63 ±4,47 <sup>Aa</sup>	86,00 ±7,24 <sup>Aa</sup>	77,75 ±5,59 <sup>Aa</sup>	90,63 ±2,30 <sup>Aa</sup>	84,38 ±3,63 <sup>Aa</sup>

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

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

CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50µM CLA; T100 = MBL+100µM CLA e T150 = MBL+150µM CLA.

EPM = erro padrão da média.

A avaliação entre a porcentagem de espermatozoides com função mitocondrial (CFM) demonstrou não haver diferença entre touros no mesmo tratamento e podem ser observadas na Tab. 13.

Tabela 13 - Espermatozoides com função mitocondrial (CFM) avaliados pela associação de sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência em sêmen descongelado de diferentes touros.

Touros	Média ± EPM, %				
	CP	CN	T50	T100	T150

A1	18,75 ±4,79 <sup>Aa</sup>	15,75 ±5,83 <sup>Aa</sup>	32,50 ±9,01 <sup>Aa</sup>	23,25 ±14,39 <sup>Aa</sup>	21,88 ±6,85 <sup>Aa</sup>
A2	30,75 ±5,29 <sup>Aa</sup>	26,75 ±8,06 <sup>Aa</sup>	16,67 ±6,04 <sup>Aa</sup>	13,13 ±3,27 <sup>Aa</sup>	12,50 ±1,15 <sup>Aa</sup>
A3	21,63 ±6,96 <sup>Aa</sup>	38,33 ±9,27 <sup>Aa</sup>	16,00 ±5,2 <sup>Aa</sup>	9,17 ±1,26 <sup>Aa</sup>	27,25 ±11,69 <sup>Aa</sup>
A4	26,50 ±7,52 <sup>Aa</sup>	20,13 ±3,61 <sup>Aa</sup>	30,00 ±7,81 <sup>Aa</sup>	30,13 ±8,87 <sup>Aa</sup>	36,88 ±7,45 <sup>Aa</sup>

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

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

CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50µM CLA; T100 = MBL+100µM CLA e T150 = MBL+150µM CLA.

EPM = erro padrão da média.

A porcentagem de espermatozoides contendo membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e função mitocondrial (PIAIC) são apresentadas na Tab. 14. A comparação dos touros no CN demonstrou que o A2, A3 e A4 não diferiram, porém o A2 e o A4 apresentaram valores intermediários.

Tabela 14 - Espermatozoides contendo membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e função mitocondrial (PIAIC) avaliados pela associação de sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência em sêmen descongelado de diferentes touros.

Touros	Média ± EPM, %				
	CP	CN	T50	T100	T150
A1	17,25 ±4,79 <sup>Aa</sup>	14,88 ±5,61 <sup>Ab</sup>	31,88 ±8,93 <sup>Aa</sup>	22,50 ±13,91 <sup>Aa</sup>	21,00 ±7,14 <sup>Aa</sup>
A2	27,63 ±5,24 <sup>Aa</sup>	20,38 ±6,77 <sup>Aab</sup>	15,83 ±5,84 <sup>Aa</sup>	12,75 ±3,17 <sup>Aa</sup>	12,17 ±0,88 <sup>Aa</sup>
A3	20,50 ±7,32 <sup>Aa</sup>	37,33 ±9,03 <sup>Aa</sup>	14,38 ±4,41 <sup>Aa</sup>	8,67 ±1,66 <sup>Aa</sup>	27,13 ±11,60 <sup>Aa</sup>
A4	25,38 ±7,07 <sup>Aa</sup>	20,00 ±3,52 <sup>Aab</sup>	29,38 ±7,88 <sup>Aa</sup>	29,63 ±8,98 <sup>Aa</sup>	30,38 ±9,13 <sup>Aa</sup>

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

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

CP = MB; CN = MB + 1% lauril sulfato de sódio (MBL); T50 = MBL+50µM CLA; T100 = MBL+100µM CLA e T150 = MBL+150µM CLA.

EPM = erro padrão da média.

## DISCUSSÃO

Nas avaliações da MES, MT e MP não foram observadas diferenças entre os tratamentos. No entanto, a comparação do desempenho dos touros nos tratamentos demonstrou variação de resposta entre indivíduos. Kaeoket et al. (2010) adicionaram

DHA ao meio de diluição de sêmen suíno e observaram maior motilidade nos tratamentos que usaram o ácido graxo, sendo também observadas diferentes respostas entre os animais. Takahashi et al. (2012), após incubarem espermatozoides de um touro com baixa congelabilidade espermática com ácido linoléico durante 30 horas e submeterem ao congelamento/descongelamento, observaram alta motilidade espermática e descrevem que os efeitos benéficos do uso de ácidos graxos nos meios de diluição de sêmen devem-se à possibilidade da manutenção da fluidez da membrana e são atribuídos à incorporação do ácido linoléico a membrana.

Nas avaliações realizadas pelo CASA não foram observadas diferenças entre os tratamentos, porém ao avaliar os touros dentro de cada tratamento foram constatadas diferentes respostas entre os indivíduos nas variáveis analisadas e nas diferentes concentrações de CLA. Gillan et al. (2008) avaliaram sêmen de touro pós-descongelamento e determinaram valores de VSL = 100 $\mu$ m/s, VCL = 155 $\mu$ m/s, LIN = 65% e ALH = 5,5 $\mu$ m, caracterizando o espermatozoide bovino como hiperativado. No presente estudo, na VSL e na LIN todos os espermatozoides analisados nos respectivos tratamentos e touros apresentaram valores inferiores ao estipulado, porém na VCL o A1 (T50, T100 e T150), o A2 (T150) e o A4 (T50, T100) apresentaram valores acima dos observados por Gillan et al. (2008). Na ALH todos os touros em todos os tratamentos apresentaram valores maiores que os citados, com exceção do A2 no T100 e do A3 no T150, que tiveram valores inferiores.

A avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal e a função mitocondrial, por meio das sondas fluorescentes, demonstrou não haver diferenças entre tratamentos. Apesar de ser detectada uma menor porcentagem de espermatozoides com acrossomo intacto em apenas dois touros e em dois tratamentos, não podemos afirmar que as diferentes concentrações de CLA possam influenciar na fluidez da membrana plasmática. Kaeoket et al. (2010) relataram uma maior porcentagem de espermatozoides suínos com acrossomo intacto após o descongelamento quando adicionaram DHA ao meio de diluição, havendo também observado diferenças nas respostas entre animais.

## CONCLUSÕES

As diferentes concentrações dos isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA), utilizadas no meio diluidor para congelamento de

sêmen de touro, não apresentaram efeito sobre a integridade de membranas e sobre a funcionalidade dos espermatozoides de touros submetidos à criopreservação, porém houve diferenças entre indivíduos.

### **Agradecimentos**

À Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina - CIDASC, Central de Inseminação Artificial, pela disponibilização dos touros e utilização dos equipamentos e instalações.

Ao Laboratório de Biotecnologias do Sêmen e Andrologia do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, *Campus* Administrativo de Pirassununga, pela cedência de laboratório e equipamentos para a realização das técnicas pós-descongelamento.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Bavister, B.D.; Leibfried, M.L.; Lieberman, G.** Development of preimplantation embryos of golden hamster in a defined medium. *Biol. Reprod.*, v. 28, n. 1, p. 235-247, 1983.
- Celeghini, E.C.C; Arruda, R.P.; Andrade, A.F.C; et al.** Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 42, p. 479-488, 2007.
- Cerolini, S.; Pizzi, F.; Gliozzi, T.; Maldjian, A.; et al.** Lipid manipulation of chicken semen by dietary means and its relation to fertility: a review. *World's Poultry Sci J.*, v. 59 (1), p. 65-75, 2003.
- Darwich, A.A.; Perreau, C.; Petit, M.H.; et al.** Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK $\alpha$  phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. *Prost. e other Lip. Med* v. 93, p. 30–36, 2010.
- Gillan L.; Kroetsch, T.; Maxwell, W.M.C.; Evans, G.** Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *An. Reprod. Science*, v. 103, p. 201-214, 2008.

**Hochi, S., Kimura, K.; Hanada, A.** Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. *Theriog.*, v. 52, p. 497-504, 1999.

**Hossain, M.D.S.; Tareq, K.M.A.; Hammano, K.; Tsujii, H.** Effect of fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction. *Repr. Med. e Biol.*, v. 6, p. 235, 2007.

**Kaeoket, K.; Sang-urai, P.; Thamniyom, A.; Chanapiwat, P.; et al.** Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. *Reprod. Dom. Anim.* v. 45, p. 458-463, 2010.

**Nasiri, A.H.; Towhidi, A.; Zeinoaldini, A.** Combined effect of DHA and  $\alpha$ -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *Andrologia*, v. 44, p. 550-555, 2012.

**Parks, J.E.; Graham, J.K.** Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, p. 209-222, 1992.

**Pereira, R.M.; Baptista, M.C.; Vasques, M.I.; et al.** Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). *An. Reprod. Scien.*, v. 98, p. 293–301, 2007.

**Pereira, R. M.; Carvalhais, I.; Pimenta, J.; et al.** Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. *An. Reprod. Scien.*, v. 106, p. 322-332, 2008.

**Pérez-Pé, R.; Cebrian-Pérez, J.A.; Muño-Blanco, T.** Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriog.* v.56, p.425-434, 2001.

**Stubbs, C.D.; Smith, A.D.** The modification of the mammalian membrane of polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function, *Biochem. Biophys. Acta.* v. 779, p. 89-137. 1984

**Takahashi, T.; Itoh, R.; Nishinomiya, H.; et al.** Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 47, p. 92-97, 2012.

**Tominaga, K.; Hamada, Y.; Yabuue, T; Ariyoshi, T.** Effect of Linoleic Acid-Albumin on Post-Thaw Survival of *in vitro*-Produced Bovine Embryos at the 16-Cell Stage. J. Vet. Med. Sci., v. 62 (4), p. 465-467, 2000.

**Waterhouse, K.E.; Hofmo, P.O.; Tverdal, A.; Miller Jr, R.R.** Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. Reproduction, 131, p. 887-894, 2006.

**Watson, P.F.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci, v. 60/61, 481-492, 2000.

## 5. CONCLUSÕES FINAIS

A adição dos isômeros *cis-9,trans-11* e *trans-10,cis-12* do ácido linoleico conjugado (CLA), nas concentrações utilizadas, não causou alterações sobre a integridade e funcionalidade dos espermatozoides bovinos submetidos à criopreservação.

As diferentes concentrações dos isômeros *cis-9, trans-11* e *trans-10, cis-12* do ácido linoleico conjugado (CLA), utilizadas no meio diluidor para congelamento de sêmen de touro, não apresentaram efeito sobre a integridade de membranas e sobre a funcionalidade dos espermatozoides de touros submetidos à criopreservação, porém houve diferenças entre indivíduos.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAYASEKARA, D. R. E.; WHATES, D. C. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 61, n. 5, 275-288, 1999.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.; **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 506p.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RALFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Membrane structure. In: **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Publishing. 1994. p. 478-506.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal Function. In: **Equine Reproduction** (A.O. McKinnon e J.L. Voss Eds.) Lea e Febiger. Philadelphia, London. 1993. p. 715-745.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, 145-174, 1987.

ASHIZAWA, K.; WISHART, G.J.; RANASINGHE, A. R. A. H.; KATAYAMA, S.; TSUZUKI, Y. Protein phosphatase-type 2B is involved in the regulation of the acrosome reaction but not in the temperature-dependent flagellar movement of fowl spermatozoa. **Reproduction**, v. 128, n. 6, 783-787, 2004.

BARRERA-COMPEAN, M. H.; PURDY, P. H.; DZAKUMA, J. M.; NEWTON, G. R.; NUTI, L. C. Cholesterol-loaded cyclodextrins improves post-thaw goat sperm motility. **Journal of Animal Science**, 83 (suppl. 1): 153, 2005.

CHENG, F. P.; WU, J. T.CHAN, J. P.; WANG, J. S.; FUNG, H. P.; COLENBRANDER, B.; TUNG, K. C. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrossosomal integrity and longevity in cryopreserved semen od Formosan Sika deer and Formosa Sambar deer. **Theriogenology**, v. 61, 1605-1616, 2004.

CHIN, S. F.; LIU, W.; STORKSON, J. M.; HA, Y. L.; PARIZA, M. W. Dietary Sources of Conjugated Dienoic Isomers of Linoleic Acid, a Newly Recognized Class of Anticarcinogens. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 5, 185-197, 1992.

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v. 20, n. 2, 83-94, 1996.

DARWICH, A. A.; PERREAU, C.; PETIT, M. H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT, F. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK $\alpha$  phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins e other Lipid Mediators**, v. 93, 30-36, 2010.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds.) **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. Cap. 2, p. 29-77.

FLESH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469 (3), 197-235, 2000.

GADELLA, B. M.; MILLER, N. G. A.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L. M. G.; HARRISON, R. A. P. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: Elimination of labeling artifacts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, n. 1, 108-125. 1999.

GIRAUD, M.N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D. et al. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, n.10, 2160-2164, 2000.

HAMMERSTED, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-78, 1990.

HENRICKS, D. M. Biochemistry and physiology of the gonadal hormones. In: Cupps, P. T. **Reproduction in domestic animal**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1981. p. 81-118.

HOCHI, S., KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. **Theriogenology**, v. 52, p. 497-504, 1999.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000.

HOSSAIN, M. D. S.; TAREQ, K. M. A.; HAMMANO, K.; TSUJII, H. Effect of fatty acids on boar sperm motility, viability and acrosome reaction. **Reproductive Medicine e Biology**, v. 6, 235, 2007.

IMAI, K. Cryopreservation of bovine embryos obtained by in-vitro culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. **Theriogenology**, v. 47, 347, 1997

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, 743-758, 2003.

KAEOKET, K.; SANG-URAI, P.; THAMNIYOM, A.; CHANAPIWAT, P.; TECHAKUMPHU, M. Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. **Reproduction Domestic Animal**, v. 45, 458-463, 2010.

LAPA, M; MARQUES, C. C.; ALVES, S. P.; VASQUES, M. I.; BAPTISTA, M. C.; CARVALHAIS, I.; PEREIRA, M. S.; HORTA, A. E. M.; BESSA, R. J. B.; PEREIRA, R. M. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on Bovine Oocyte Competence and Fatty Acid Composition. **Reproduction Domestic Animal**, v. 46, 904-910, 2011.

LAPOSATA, M. Fatty acids. Biochemistry to clinical significance. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 104. n. 2, 172-179, 1995.

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

LI, Q., WANG, M., TAN, L., WANG, C., MA, J., LI, N., LI, Y., XU, G., LI, J. Docosahexaenoic acid changes lipid composition and interleukin-2 receptor signaling in membrane rafts. **Journal of Lipid Research**, v. 46, 1904–1913. 2005.

LIU, S., BARACOS, V., QUINNEY, H., CLANDININ, M. Dietary omega-3 and polyunsaturated fatty acids modify fatty acyl composition and insulin binding in skeletal-muscle sarcolemma. **Biochemical Journal**, 299, 831. 1994.

MA, D. W. L., SEO, J., DAVIDSON, L. A., CALLAWAY, E. S., FAN, Y.-Y., LUPTON, J. R., CHAPKIN, R. S. n-3 PUFA alter caveolae lipid composition and resident protein localization in mouse colon. **FASEB Journal**, v. 18, 1040-1042, 2004.

MANN, T. Lipids and lipid-soluble substances. In: **The biochemistry of semen and of the male reproductive tract**. Great Britain: Butle e Tanner p. 221-236. 1964.

MARTIN-RILLO, S.; MARTINEZ, E.; GARCIA-ARTIGA, C.; DE-ALBA, C. Boar semen evaluation in practice. **Reproduction Domestic Animal**, v. 31, n. 4, 519-526, 1996.

MCDOWELL, L. R. **Vitamin in animal nutrition: comparative aspect to human nutrition**. Washington: Academic, 1989, p. 486.

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, 403-439, 1997.

MORTIMER, S. T. CASA-practical aspects. **Journal of Andrology**, v.21, 51-524, 2000.

NASIRI, A. H.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, A. Combined effect of DHA and  $\alpha$ -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. **Andrologia**, v. 44, 550-555, 2012.

OKAZAKI, T. Effect of linoleic acid-bovine serum albumin on the survival of in vitro produced bovine blastocysts after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, 354, 1997.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v. 122, 105-151, 1990.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, 283-298, 2001.

- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, 209-222, 1992.
- PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, 255-266, 1992.
- PEREIRA, R. M.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M.; PORTUGAL, P. V.; BESSA, R. J. B.; SILVA, J. C.; PEREIRA, M. S.; MARQUES, C. C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). **Animal Reproduction Science**, v. 98, 293-301, 2007.
- PEREIRA, R. M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M.; SANTOS, I. C.; MARQUES, M. R.; REIS, A.; PEREIRA, M. S.; MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 322-332, 2008.
- PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIAN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.56, p. 425-434, 2001.
- PETER, SURAI.; RAYMOND, C. N. Male fertility with antioxidants and/or polyunsaturated fatty acids. Patente N° 6235783. United States, 2001.
- PETERS, A. R.; BALL, P. J. H. **Bull Fertility**. Reproduction in Cattle. 3<sup>a</sup> Edition. Blackwell Publishing, 2004, p. 28-39.
- POULOS,A.; SHARP, P.; JOHNSON, D.; WHITE,I.; FELLEBERG, A. The occurrence of polyenoic fatty acids with greater than 22 carbon atoms in mammalian spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 240, n. 3, 895-891, 1986.
- ROBERTSON, J. D. Membrane structure. **The Journal of Cell Biology**. v. 91, n. 3, 189s-204s, 1981.
- ROCHE, H. M. Unsaturated fatty acids. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, n. 2, 397-401, 1999.

ROUX, C.; TRIPOGNEY, C.; JOANNE, C.; BRESSON, J. L. Qualité nucléaire du spermatozoïds humains (protéines nucléaires). **Gynécologie Obstétrique e Fertilité**. v. 32, 792-798, 2004.

SATA, R.; TSUJII, H.; ABE, H.; YAMASHITA, S.; HOCHI, H. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. **Journal Reproduction Development**, v. 45, 97-103, 1999.

SINGER, S. J., NICHOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, 720-731, 1972.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Progress in Lipidic Research**, v. 47, p. 147-155, 2008.

STUBBS, C. D.; SMITH, A. D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 779, 89-137, 1984.

STULNIG, T., HUBER, J., LEITINGER, N., IMRE, E., ANGELISOVA, P., NOWOTNY, P., WALDHAUSL, W. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid displaces proteins from membrane rafts by altering raft lipid composition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n.40, 37335-37340, 2001.

SUDHEERA, S. D.; JAMES, W. L.; FALCONER, L.; GARG, M. L. Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 4, 383-393, 1997.

TAKAHASHI, T.; ITOH, R.; NISHINOMIYA, H.; KATOH, M.; MANABE, N. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. **Reproduction Domestic Animal**, v. 47, 92-97, 2012.

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y.; YABUUE, T; ARIYOSHI, T. Effect of Linoleic Acid-Albumin on Post-Thaw Survival of in vitro-Produced Bovine Embryos at the 16-Cell Stage. **Journal Veterinary Medicine Science. Japan, The Journal of Veterinary Medical**, v. 62, n.4, 465-467, 2000.

VANDENHEUVEL, F. A. Structure of membranes and role of lipids therein. In: **Advances in Lipid Research**. Eds. R. Paoletti and D. Kritchevsky. Academic Press, New York, 1971.

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

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: **Effects of low temperatures on biological membranes**. G. J. Morris and A. Clarke, eds. Academic Press, London, p. 189-218, 1981.

ZHAO, G., SUBBAIAH, P. V., CHIU, S. W., JAKOBSSON, E., SCOTT, H. L. Conjugated double bonds in lipid bilayers: a molecular dynamics simulation study. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 164, 251-257. 2011a.

ZHAO, G., SUBBAIAH, P. V., MINTZER, E., CHIU, S. W., JAKOBSSON, E., SCOTT, H. L. Molecular dynamic simulation study of cholesterol and conjugated double bonds in lipid bilayers. **Chemistry and Physics of Lipid**, v. 164, 811-818. 2011b.

## 7. ANEXOS

### 7.1 Meio Diluidores

#### Meio básico (MB)

DILUTRIS <sup>®</sup> -SEMENCOM, Brasil	_____	100 mL
Água destilada	_____	300 mL
Gema de ovo	_____	100 mL

#### Meio com Lauril Sulfato de Sódio a 1% (MB + LSS)

Meio base (MB)	_____	396 mL
Equex Paste <sup>®</sup> (Minitube)	_____	4 mL



## 7.2 Preparação dos tratamentos (CLA)

### Tratamento Controle Positivo (CP)

MB \_\_\_\_\_ 100 mL

### Tratamento Controle Negativo (CN)

MB \_\_\_\_\_ 100 mL

### Tratamento 50 (T50)

Ácido linoleico conjugado (CLA) 50  $\mu$ M  
MB + LSS (QSP) \_\_\_\_\_ 100 mL

### Tratamento 100 (T100)

Ácido linoleico conjugado (CLA) 100  $\mu$ M  
MB + LSS (QSP) \_\_\_\_\_ 100 mL

### Tratamento 150 (T150)

Ácido linoleico conjugado (CLA) 150  $\mu$ M  
MB + LSS (QSP) \_\_\_\_\_ 100 mL

### 7.3 Solução de sais do TALP (BAVISTER et al., 1983)

#### Preparação de 500 mL

##### Componentes:

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

##### 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
- Manter resfriado

## 7.4 Solução dos metabólitos glicosados

### A. SOLUÇÃO ESTOQUE (para preparar 50 mL)

#### Componentes:

- Glicose ..... 2.5 g
- Lactato de Sódio ..... 9.25 mL
- Piruvato de Sódio ..... 70 mg
- Pen-Strep ..... 12.5 M L

#### Preparo:

- Dissolver todos os componentes
- Aliquotar (alíquotas de 5 mL)
- Manter em freezer (-20° C)

### B. Solução Trabalho

- Colocar 45 mL da Solução de Sais do TALP
- Ajustar o pH para 7,4
- Colocar 5 mL da Solução Estoque dos Metabólitos Glicosados
- Aliquotar (alíquotas de 300 mL)
- Manter em freezer (-20° C)

### PREPARO NO DIA

#### Componentes:

- 10 mL da Solução de Sais do TALP
- 200 mL da Solução (trabalho) de Metabólitos Glicosados
- 100 mg de soro albumina bovina (BSA)

#### Preparo:

- Dissolver o BSA em incubador a 37°C por 10 minutos
- Ajustar o pH para 7,4

## 7.5 Diluições e preparo das sondas fluorescentes

**IODETO DE PROPÍDIO** (Sigma-Aldrich, 28,707-5 - 25 mg)

SOLUÇÃO ESTOQUE

25 mg de PI + 1 mL de DMSO (25 mg/mL)

SOLUÇÃO TRABALHO (0,5 mg/mL)

20 µL da solução estoque de PI (25 mg/mL) + 980 µL de DPBS

Obs: Aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.

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

SOLUÇÃO ESTOQUE (0,5mg/mL)

2 mg de FITC-PSA + 4 mL de DPBS

SOLUÇÃO TRABALHO (100 µg/mL)

2 mL solução estoque + 8 mL de DPBS

Obs: Aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.

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

SOLUÇÃO ESTOQUE (DMSO) - 1,53 mM

SOLUÇÃO TRABALHO (DMSO) - 153 µM

Obs: Aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.

**HOECHST 33342 (Molecular Probes, H-1399 – 100 mg)**

SOLUÇÃO ESTOQUE (DMSO)

100 mg H33342 + 2 mL de DMSO (50 mg/mL)

SOLUÇÃO TRABALHO (DPBS) (5 mg/mL)

50 µL da solução estoque (25 mg/mL) + 450 µL de DPBS

Obs: Aliquotar as soluções e mantê-las congeladas e protegidas da luz.