

Efeito da inibição da óxido nítrico sintase induzível na capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos

[Effect of inhibition of inducible nitric oxide synthase on *in vitro* capacitation of bovine spermatozoa]

J.B.P. Ferreira-Berbari, M.C. Caldas-Bussiere*, C.S. Paes de Carvalho, K.S. Viana, A.C.S.M. Leal, C.R. Quirino

Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – UENF
Av. Alberto Lamego, 2000
28013-602 – Campos dos Goytacazes, RJ

RESUMO

Avaliaram-se o papel do óxido nítrico (NO) por meio da inibição da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), após a adição da aminoguanidina (AG), na motilidade, no vigor e na integridade da membrana plasmática nos tempos de 15, 60, 120, 180, 240 e 300min e a atividade mitocondrial e a capacitação de espermatozoides bovinos após 300min de cultivo. Adicionaram-se diferentes concentrações (0,001, 0,01 e 0,1M) de AG durante a capacitação induzida pela heparina e 500 μ M de nitroprussiato de sódio (SNP, doador de NO) à concentração deletéria. A adição de 0,1M de AG diminuiu a motilidade e o vigor espermático e a integridade da membrana ($P<0,05$). A adição de SNP ao meio de cultivo com 0,1M de AG somente reverteu a integridade da membrana após 300min. A inibição da síntese de NO pela adição de AG não alterou a atividade mitocondrial. A percentagem de oócitos penetrados com espermatozoides tratados com 0,01 e 0,1M de AG diminuiu 20,3 e 100%, respectivamente, em relação aos não tratados (controle) ($P<0,05$), contudo houve aumento de 15% na percentagem de oócitos desnudados penetrados com espermatozoides capacitados em presença de 0,1M de AG. Conclui-se que a inibição da síntese de NO pela AG diminuiu a qualidade espermática durante a capacitação de espermatozoides bovinos *in vitro*, exceto a atividade mitocondrial. Somente a integridade da membrana foi revertida após adição de NO, sugerindo diferentes vias de ação do NO na qualidade espermática ao longo da capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos.

Palavras-chave: bovino, óxido nítrico, qualidade do espermatozoide, capacitação *in vitro*, aminoguanidina

ABSTRACT

The role of nitric oxide (NO) was evaluated by inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS), with aminoguanidine (AG) on motility, vigor, and plasmatic membrane integrity of bovine spermatozoa culture after 15, 60, 120, 180, 240, and 300min and on mitochondrial activity and capacitation after 300min, respectively. Different concentrations, 0.001, 0.01, and 0.1M of AG were added during the heparin induced capacitation and sodium nitroprusside (SNP, NO donor-500 μ M) to the deleterious concentration. The addition of 0.1M of AG diminished progressive motility, spermatic vigor, and membrane integrity ($P<0.05$). SNP addition to the 0.1M of AG did revert only plasmatic membrane integrity after 300min. Mitochondrial activity was not influenced by addition of AG. Percentage of penetrated oocytes after addition of 0.01 and 0.1M of AG diminished, 20.3 and 100%, respectively, in relation to the control oocytes ($P<0.05$). However, an increase of 15% was observed when denuded oocytes were used with 0.1M AG treated sperm ($P<0.05$). It was concluded that the inhibition of NO synthesis with aminoguanidine diminished sperm quality during *in vitro* capacitation of bovine spermatozoa, except the mitochondrial activity. Only membrane integrity was reverted with the addition of NO to culture medium, suggesting different pathways of NO action on bovine sperm quality during *in vitro* capacitation.

Keywords: bovine, nitric oxide, aminoguanidine, sperm quality, *in vitro* capacitation

Recebido em 16 de julho de 2009

Aceito em 3 de maio de 2010

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: claracal@uenf.br

INTRODUÇÃO

Espermatozoides de mamíferos, após deixarem os testículos, sofrem um processo de maturação, adquirindo motilidade progressiva durante o trânsito no epidídimo, no entanto, continuam incompetentes para fecundação (Visconti e Kopf, 1998). As mudanças fisiológicas que conferem aos espermatozoides habilidade de fertilizar são denominadas de capacitação (O'Flaherty et al., 1999). Embora a capacitação espermática seja estudada há aproximadamente meio século, as bases moleculares deste processo são pouco compreendidas em bovinos, sendo, porém, fundamental para o desenvolvimento das biotecnologias da reprodução, uma vez que, em sua maioria, há necessidade da fertilização do oócito.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre de meia vida curta (De Lamirande, 1997), originado a partir da L-arginina, em uma reação catalizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Foram identificadas quatro isoformas da NOS: óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e óxido nítrico sintase mitocondrial (mtNOS), denominadas também de óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS), além da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Francavilla et al., 2000).

Estudos *in vitro* demonstram que a baixa concentração de NO estimula a motilidade em camundongos (Herrero et al., 1994), hamsters (Yeoman et al., 1998) e humanos (Hellstrom et al., 1994), a reação acrossômica em camundongos (Herrero et al., 1997) e touros (Zamir et al., 1995) e a habilidade de ligação à zona pelúcida em humanos (Sengoku et al., 1998).

Paes de Carvalho et al. (2003) demonstraram, pela primeira vez em bovinos, que o NO induz à capacitação *in vitro* de espermatozoides criopreservados, porém sua ação é menos efetiva do que a da heparina. Além disso, durante a capacitação induzida pela heparina, espermatozoides sintetizam NO (Leal et al., 2009). A participação do NO na capacitação de espermatozoides bovinos tem sido descrita na integridade da membrana, vigor e motilidade durante a capacitação (Paes de Carvalho et al., 2003; Rodriguez et al., 2004; Leal et al., 2009). Estes dados sugerem que o NO participa dos

eventos bioquímicos que ocorrem durante a capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos.

A iNOS é seletivamente inibida pela aminoguanidina (AG), além de amidinas (Nakamura et al., 2002). Thornalley (2003) demonstrou que a AG é um potente inibidor da iNOS na concentração de 31 μ M e um fraco inibidor da nNOS e eNOS nas concentrações de 170 e 330 μ M, respectivamente, enquanto Nakamura et al. (2002) observaram que 10 e 100mM de AG diminuíram a maturação de oócitos contidos em ovários de ratas com quatro a sete folículos pré-ovulatórios. Todavia, essa inibição pode ser revertida pela adição de 500 μ M de S-nitroso-L-acetil penicilamina (SNAP), um doador de NO, demonstrando que a inibição da iNOS pela AG é reversível *in vivo*. Matta et al. (2009) demonstraram que a adição de SNP não reverteu o efeito inibitório de 100mM de AG na maturação de oócitos bovinos *in vitro*.

Herrero et al. (1997) verificaram que 0,5mM de AG não inibiu a produção de NO em espermatozoides de camundongos, sugerindo que as NOS presentes no gameta seriam as isoformas constitutivas e não a iNOS. Não há nenhum relato na literatura da presença da iNOS nos espermatozoides de bovinos.

Este trabalho teve os objetivos de avaliar o papel da iNOS na qualidade espermática durante a capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos e de estudar os mecanismos bioquímicos envolvidos durante esse evento.

MATERIAL E MÉTODOS

O sêmen utilizado foi colhido semanalmente com o uso de um eletroejaculador (Hayonik, FTM 1201, Brasil) de um touro de cinco anos da raça Guzerá, mantido em pastagens, com adequado controle sanitário. Em seguida, foram realizados os exames preliminares para avaliar a qualidade espermática – motilidade e vigor espermáticos –, considerando aptos para o início do experimento os ejaculados com espermatozoides com motilidade progressiva maior ou igual a 70% e vigor espermático maior ou igual a 3, utilizando uma escala de classificação de acordo com o CBRA (Manual..., 1998).

Efeito da inibição da óxido...

A seleção dos espermatozoides viáveis foi realizada por meio do gradiente de Percoll (Nutricell – São Paulo, Brasil) 45% e 90%, utilizando-se 250µl do sêmen centrifugado a 700 x g por 10min. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado ressuscitado em meio Tyrodes modificado (Talp), acrescido de 1mg/mL de álcool polivinílico (Sigma Chemical Co. St Louis, EUA) (Chamberland et al., 2001) ao sêmen coletado, para outra centrifugação a 200 x g por 5min. O precipitado foi novamente ressuscitado, em meio Tyrodes modificado (Parrish et al., 1988), contendo 6mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos (Sigma). Avaliaram-se, em seguida, a motilidade, o vigor e a integridade da membrana dos espermatozoides pós-gradiente de Percoll.

A capacitação espermática foi induzida utilizando-se o meio Talp-sp + BSA livre de ácidos graxos, acrescido de 20µg/mL de heparina (Sigma). A concentração do sêmen utilizada foi de 50 x 10⁶ espermatozoides/200µL.

A avaliação da viabilidade espermática foi realizada por meio da observação da motilidade e vigor espermáticos, e da integridade da membrana plasmática. Motilidade e vigor foram avaliados segundo o CBRA (Manual ..., 1998) utilizando microscópio óptico invertido (Carl Zeiss do Brasil Ltda) (700X).

A integridade da membrana espermática foi avaliada utilizando-se a coloração de azul de Trypan. À microscopia óptica, contaram-se 200 espermatozoides, verificando que os não viáveis encontravam-se corados de azul.

A atividade mitocondrial foi avaliada pelo método do MTT (Mosmann, 1983), e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570nm, com subtração de background de 620nm.

A capacitação espermática foi avaliada pelo teste de penetração em oócitos homólogos. Ovários de fêmeas bovinas mestiças cíclicas em idades variadas foram obtidos semanalmente em abatedouros. Os folículos foram aspirados, e os complexos *cumulus*-oócito (COC) foram colocados imediatamente em meio de cultura de tecidos 199 (TCM-199 - Sigma) acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB) e de 100UI/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (meio

de lavagem). Foram utilizados apenas COC com mais de três camadas de células do *cumulus* com aspecto compacto e claro, e oócito com ooplasma homogêneo.

O meio utilizado para maturação *in vitro* foi o TCM 199, acrescido de 10% de SFB, 5µg/mL de LH (Lutropin-V, Bioniche - Beleville, Canadá), 0,5µg/mL de FSH (Folltropin-V - Bioniche) e antibióticos. O cultivo foi realizado em gotas de 100µL (20 oócitos/gota) sob óleo mineral (Sigma) em estufa a 38,5°C sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 22h. Após esse período, os COC foram co-incubados com os grupos tratados com concentrações de AG que promoveram alteração da motilidade do espermatozoide.

Os espermatozoides previamente capacitados foram lavados em Talp-sp + BSA para remoção dos tratamentos e co-incubados (1,6 x10⁶ espermatozoides/mL) durante 5h, a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂, juntamente aos oócitos em meio Talp, acrescido de 6mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, 2mM de penicilamina (Sigma), 1mM de hipotaurina (Sigma), 250mM de epinefrina (Sigma), além dos antibióticos citados anteriormente (Talp-fecundação) (Parrish et al., 1988). Após esse período, realizou-se a remoção das células do *cumulus* pelo método mecânico. Os oócitos desnudados foram montados entre lâmina e lamínula, fixados em ácido acético:etanol (Merck S.A. – Rio de Janeiro, Brasil) (1:3), por 24h e corados com orceína (Sigma) a 2% em ácido acético 40% para avaliação da taxa de penetração (Brackett et al., 1982).

No experimento I, avaliou-se a cinética do espermatozoide durante a capacitação espermática, pela observação do efeito dose-resposta da inibição específica da isoforma induzível, sobre a qualidade espermática, por meio da adição de diferentes concentrações de AG, 0,001, 0,01 e 0,1M, durante a capacitação induzida pela heparina nos tempos de 15, 60, 120, 180, 240 e 300min. O controle consistiu de espermatozoides cultivados em meio de capacitação sem o inibidor da enzima iNOS. Para saber se este efeito seria impedido pela adição de NO, acrescentaram-se 500µM de SNP ao meio (Rodriguez et al., 2004), juntamente à concentração de AG que apresentou o efeito deletério (0,1M+SNP).

No experimento II, avaliaram-se a atividade mitocondrial e a capacitação dos espermatozoides após 300min de cultivo por meio do teste de penetração em oócitos homólogos, utilizando somente espermatozoides tratados com AG que apresentavam alteração na integridade da membrana e motilidade. Visto que não foi observada a penetração de nenhum COC coincubado com espermatozoides tratados com 0,1M, e os mesmos apresentavam 45% de integridade da membrana, porém imóveis, foi realizado cocultivo de espermatozoides capacitados com esta concentração, com oócitos desnudados. Todos os experimentos foram repetidos seis vezes.

Os dados foram analisados no programa SAS/1996 e submetidos à análise de variância (PROC GLM) para verificar o efeito da concentração, do tempo e da interação concentração x tempo sobre as características estudadas. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se efeito da interação tempo de avaliação versus concentração de AG sobre a motilidade espermática ($P < 0,05$). Houve redução gradual da motilidade progressiva durante a cinética avaliada (Tab. 1). No tempo de 15min, houve diferença ($P < 0,05$) entre a concentração de 0,1M de AG ($10,0 \pm 6,3\%$) em relação ao grupo-controle ($75,0 \pm 5,2\%$) e às concentrações de 0,001M ($71,7 \pm 7,5\%$) e 0,01M ($70,0 \pm 6,3\%$). A adição de SNP impediu parcialmente o efeito deletério da concentração de 0,1M de AG. No tempo 60min, a adição de 0,1M de AG diferiu do controle e das demais concentrações ($P < 0,05$), porém a adição de SNP não impediu o efeito deletério dessa

concentração de AG. Nos tempos de 120 a 300min, a concentração de 0,01M de AG diminuiu a motilidade em relação ao grupo-controle e à concentração de 0,001M de AG, e o tratamento com 0,1M de AG e 0,1M de AG + SNP resultou em ausência total de motilidade espermática. Todos os tratamentos apresentaram diminuição gradativa da motilidade ao longo do tempo, sendo este efeito dose-resposta. A ausência da motilidade progressiva pode ser atribuída ao fato de ter havido ligação desses espermatozoides na região apical da cabeça, no acrossoma, assumindo um “aspecto de sol” – grupos de mais de cinco espermatozoides, impedindo, assim, a motilidade progressiva.

Meiser e Schulz (2003) identificaram, por meio de imunocitoquímica, a presença da NOS na porção média do acrossoma, próxima à região apical da cabeça, e na peça intermediária dos espermatozoides de bovinos. Embora esses autores não tenham demonstrado a presença da iNOS, no presente estudo esta foi demonstrada por meio da inibição de sua atividade após a adição da AG. Sua presença nas regiões citadas poderia explicar as alterações no local de ligação durante a capacitação (ligação lateral da cabeça) e na variação do batimento flagelar.

A adição de $500\mu\text{M}$ de SNP a 0,1M AG impediu, parcialmente, o efeito deletério da AG na motilidade somente nos primeiros 15min, entretanto esse efeito não perdurou o que pode ser observado do tempo 60 a 300min (Tab. 1), demonstrando que os efeitos foram irreversíveis. Bilodeau-Goeseels (2007) observou em oócitos bovinos que a adição de SNP ($0,01\mu\text{M}$) não reverteu os efeitos da inibição da iNOS pela AG (10mM), após 7h de cultivo *in vitro*. Tal resultado foi semelhante aos de Matta et al. (2009), após 24h de cultivo utilizando 100mM de AG.

Tabela 1. Motilidade progressiva (%) de espermatozoides bovinos ao longo da capacitação *in vitro*, de acordo com a concentração de aminoguanidina (AG) e de $500\mu\text{M}$ de nitroprussiato de sódio (SNP)

Concentração AG	Tempo (min)					
	15	60	120	180	240	300
Controle	75,0±5,2aA	71,7±7,2aA	65,8±10,8aAB	59,2±10,8aBC	53,3±12,3aCD	47,5±11,4aD
0,001M	71,7±7,5aA	65,0±5,5aAB	55,0±12,2aBC	51,7±11,7aBC	41,7±9,8aCD	36,7±12,1aD
0,01M	70,0±6,3aA	63,3±12,1aA	38,3±13,3bB	33,3±16,3bBC	25,0±16,4bBC	16,7±15,1bD
0,1M	10,0±6,3cA	6,7±5,2bB	0,0±0,0cC	0,0±0,0cC	0,0±0,0cC	0,0±0,0cD
0,1M + SNP	43,3±28,0bA	7,0±11,7bB	0,0±0,0cB	0,0±0,0cC	0,0±0,0cB	0,0±0,0cB

Médias seguidas de letras distintas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças, para cada tempo, entre concentrações ($P < 0,05$).

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na mesma linha indicam diferenças, para cada concentração, entre tempos ($P < 0,05$).

Dados são apresentados como média ± DP de seis replicatas.

Efeito da inibição da óxido...

Neste estudo, observou-se interação de tempo de avaliação *versus* concentração de AG (Tab. 2), quando se avaliou o vigor espermático ao longo da capacitação ($P < 0,05$). Do tempo 15 a 240min, a adição de 0,1M de AG diminuiu o vigor espermático em relação ao controle e às demais concentrações. Aos 300min, esse efeito começou a ser observado a partir da adição de 0,001M de AG, diminuindo gradativamente até não apresentar nenhum vigor após a adição de 0,1M de AG. A adição de SNP à concentração mais alta de AG (0,1M) impediu o efeito deletério somente aos 15min de cultivo. Nos tempos 60 e 120min, não houve diferença entre o grupo tratado com 0,1 de AG e o grupo tratado com 0,1

de AG + SNP ($P > 0,05$), mas, a partir de 240min, os valores foram menores ($P < 0,05$).

Houve efeito dose-resposta da adição de AG no meio de cultivo em relação ao vigor ao longo da capacitação. Quando se adicionou 0,001M de AG, o vigor apresentou diferença somente no tempo 300min. Após a adição de 0,01M, essa diferença foi observada após 240min e após a adição de 0,1M de AG, com 180min. A adição de SNP ao grupo tratado com 0,1M de AG antecipou a diminuição do vigor ao longo do tempo, ($P < 0,05$). Não há nenhum relato na literatura sobre a ação do NO no vigor ao longo da capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos.

Tabela 2. Vigor espermático de espermatozoides bovinos (escala de 0-5) ao longo da capacitação *in vitro*, de acordo com a concentração de aminoguanidina (AG) e de 500 μ M de nitroprussiato de sódio (SNP)

Concentração AG	Tempo (min)					
	15	60	120	180	240	300
Controle	3,8 \pm 0,4aA	3,8 \pm 0,5aA	3,6 \pm 0,5aA	3,5 \pm 0,5aA	3,4 \pm 0,5aA	3,4 \pm 0,5aA
0,001M	3,7 \pm 0,5aA	3,5 \pm 0,5aAB	3,5 \pm 0,5aAB	3,3 \pm 0,5aAB	3,0 \pm 0,0aAB	2,8 \pm 0,4bB
0,01M	3,7 \pm 0,5aA	3,5 \pm 0,5aAB	3,3 \pm 0,5aABC	3,0 \pm 0,0aABC	2,8 \pm 0,4aBC	2,7 \pm 0,5bC
0,1M	2,3 \pm 0,5bA	2,3 \pm 0,5bA	1,7 \pm 0,5bAB	1,5 \pm 0,5bB	1,2 \pm 0,4bB	1,2 \pm 0,4cB
0,1M + SNP	3,3 \pm 0,5aA	3,0 \pm 1,1abAB	2,0 \pm 1,3bBC	1,0 \pm 1,1bCD	0,3 \pm 0,5cD	0,0 \pm 0,0dD

Médias seguidas de letras distintas minúsculas na mesma coluna indicam diferenças, para cada tempo, entre concentrações ($P < 0,05$).

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na mesma linha indicam diferenças, para cada concentração, entre tempos ($P < 0,05$).

Dados são apresentados como média \pm DP de seis replicatas.

A análise de variância mostrou que não houve interação de tratamento *versus* tempo quando se avaliou a integridade da membrana plasmática. Ocorreu diminuição da integridade da membrana dose-resposta em relação ao grupo-controle ($P < 0,05$). Estes dados confirmam os já observados em espermatozoides humanos (Rosselli et al., 1995) e bovinos (Leal et al., 2009) quando se utilizou outro inibidor da síntese de NO, o N ω -nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME.

A adição de 500 μ M de SNP ao grupo tratado com 0,1M de AG (75,7 \pm 8,6%) impediu a ação deletéria na integridade da membrana causada pela utilização de apenas 0,1M de AG (41,3 \pm 8,2%) (Fig. 1). Isto pode ser explicado pelo fato de a via NOS/NO possuir importante ação antioxidante, que protege a célula da peroxidação lipídica (Srivastava et al., 2006; Leal et al., 2009), que resultaria na modificação de moléculas lipídicas da membrana plasmática do espermatozoide, diminuindo sua viabilidade

(Thomas et al., 2008). Este achado confirma os resultados obtidos por Hellstrom et al. (1994), que observaram que a adição de 50 a 100nM de SNP ao sêmen humano criopreservado levou à diminuição da peroxidação lipídica e ao aumento da integridade da membrana plasmática do espermatozoide com efeito dose-dependente durante 6h de avaliação.

Observou-se influência do tempo de observação sobre a integridade da membrana, ou seja, o percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra diminuiu a partir dos 120min de avaliação, e assim se manteve até o tempo de 300min (Fig. 2).

Não houve diferença ($P > 0,05$) na atividade mitocondrial (absorbância) avaliada pelo teste MTT de espermatozoides tratados com 0,001M (479,2 \pm 60,1), 0,01M (587,5 \pm 69,9) e 0,1M (588,8 \pm 102,61) de AG em relação ao controle (545,4 \pm 94,6) (Fig. 3). A diminuição na concentração celular de NO afeta a atividade

mitocondrial por causar desbalanço na razão NO/O₂, uma que vez que compete pelo centro de reação da enzima citocromo oxidase (Boveris et al., 1999). Porém, neste experimento, não se observou diminuição na atividade mitocondrial de espermatozoides bovinos, sugerindo que a adição de AG não tenha levado ao desbalanço na razão NO/O₂ na mitocôndria, ou que, de certa

forma, a inibição não tenha levado a uma redução drástica na concentração para levar a este desbalanço. Contudo, a adição de SNP à concentração mais elevada de AG (0,1M) apresentou absorvância menor (443,8±45,0) do que a dos grupos 0,01 e 0,1M de AG. Mais estudos são necessários para explicar esse resultado.

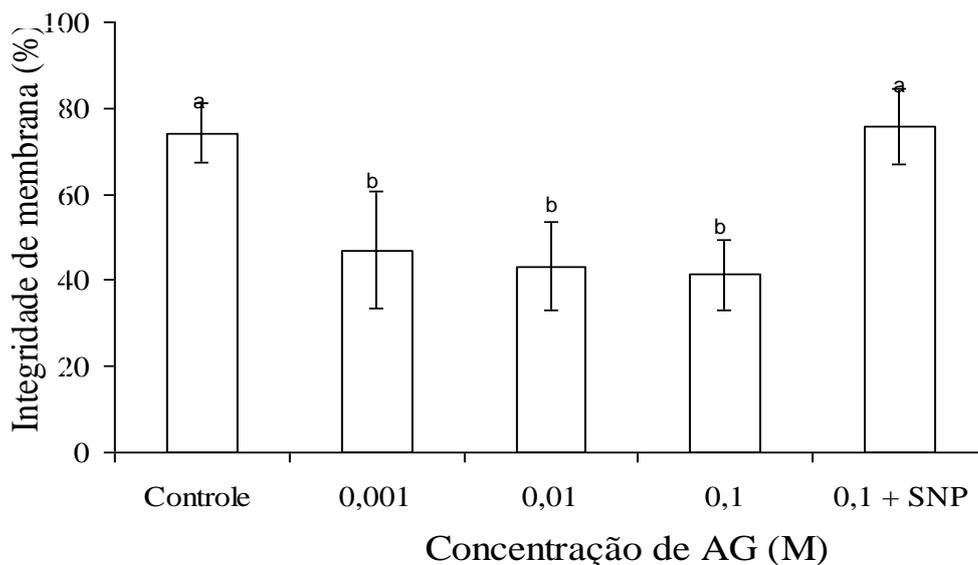


Figura 1. Percentagem de espermatozoides bovinos com membrana plasmática íntegra ao longo da capacitação *in vitro*, de acordo com a concentração de aminoguanidina (AG) e de 500µM de nitroprussiato de sódio (SNP). Dados indicam como média ± DP de seis replicatas. Letras diferentes apresentam diferenças (P<0,05) quanto à integridade da membrana.

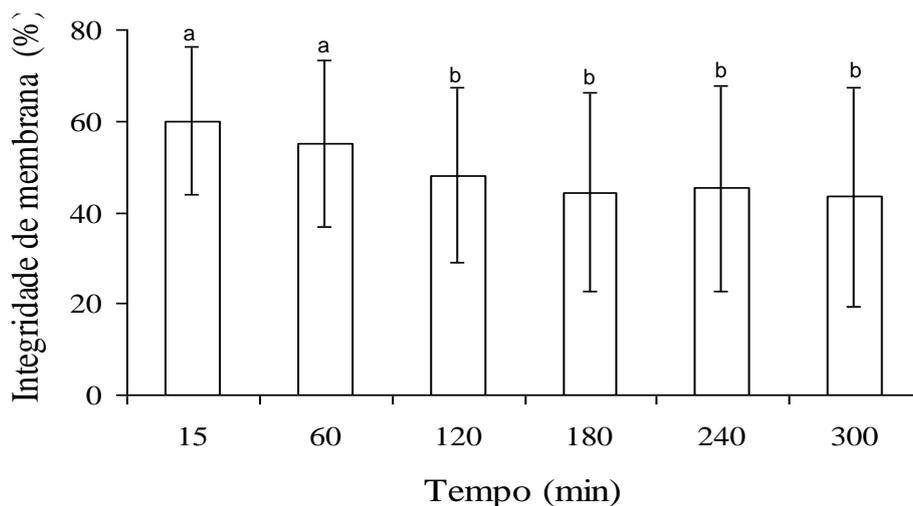


Figura 2. Médias (%) e desvio-padrão de espermatozoides bovinos com membrana plasmática íntegra ao longo da capacitação *in vitro*, após a adição de aminoguanidina no meio de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças (P<0,05; n=6) quanto à integridade da membrana.

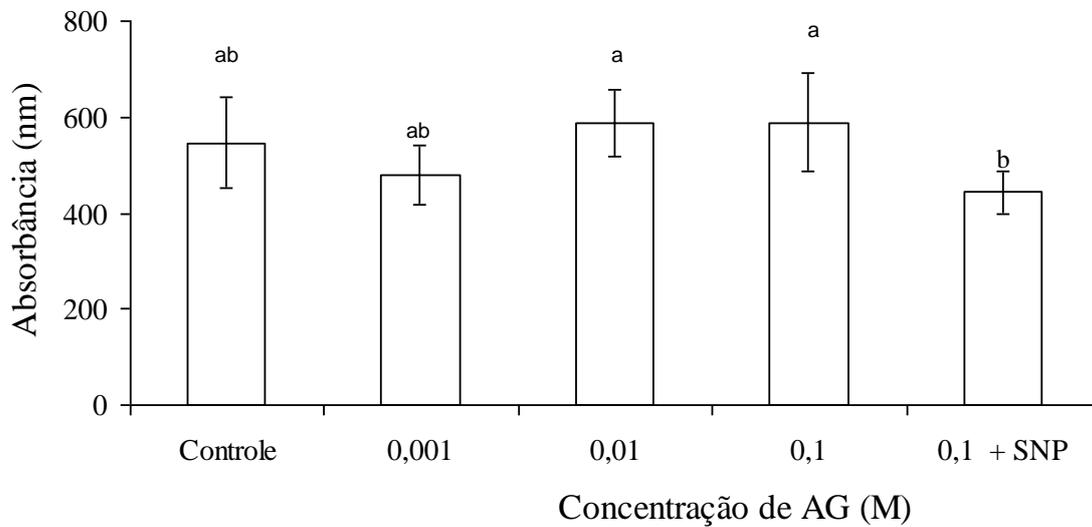


Figura 3. Atividade mitocondrial de espermatozoides bovinos ao longo da capacitação *in vitro*, de acordo com a concentração de aminoguanidina (AG) e de 500 μ M de nitroprussiato de sódio (SNP). Dados são apresentados como média \pm DP de seis replicatas. Letras diferentes indicam diferenças ($P < 0,05$) quanto à atividade mitocondrial.

Houve efeito dose-resposta da adição de AG no meio de cultivo na capacitação de espermatozoides bovinos avaliada pelo teste de penetração em COC homólogos ($P < 0,05$). A taxa de penetração de oócitos coincubados com espermatozoides tratados com 0,01M de AG

(43,7 \pm 7,6%) e 0,1M de AG (0,0 \pm 0,0%) diminuiu em relação ao grupo-controle (54,8 \pm 6,2%), e a adição de SNP ao grupo tratado com 0,1M de AG impediu, parcialmente, o efeito deletério dessa concentração de AG na capacitação espermática (Fig. 4).

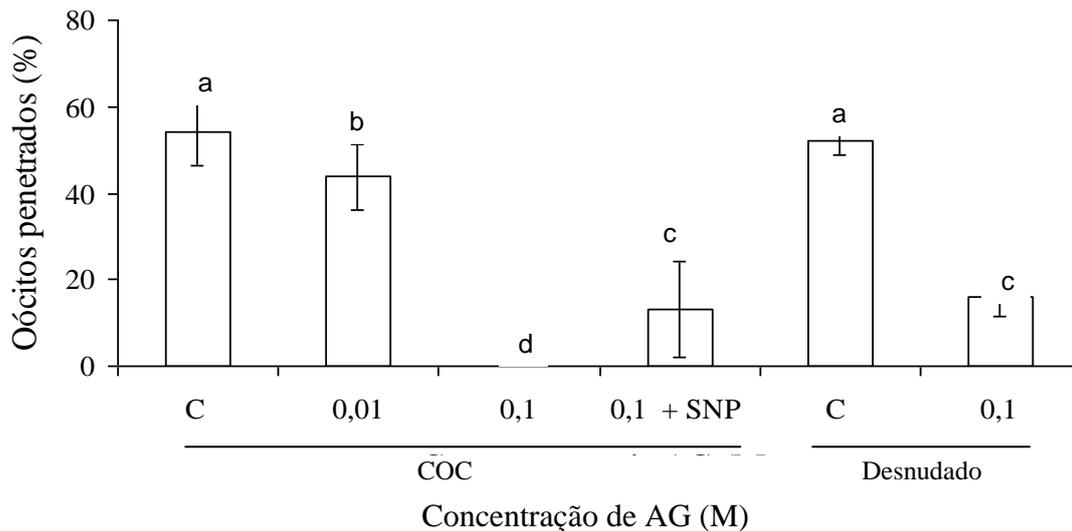


Figura 4. Percentagem de complexos *cumulus*-oócito (COC) e oócitos desnudados penetrados por espermatozoides capacitados *in vitro*, previamente (5h), em presença de diferentes concentrações de aminoguanidina (AG) e de 500 μ M de nitroprussiato de sódio (SNP). Dados são apresentados como média \pm DP de seis replicatas. Letras diferentes indicam diferenças ($P < 0,05$) quanto à percentagem de oócitos penetrados.

A princípio acreditava-se que a ausência da motilidade progressiva e a diminuição da integridade da membrana seriam as principais causas para este fato. Porém, ao utilizar-se oócitos desnudados coincubados com espermatozoides capacitados em presença de 0,1M de AG, observou-se uma taxa de penetração de $15,2 \pm 4,4\%$, semelhante à observada com espermatozoides tratados com 0,1M de AG + SNP ($13,1 \pm 11,0\%$) coincubados com oócitos com células do *cumulus* (COC). Dentre as possíveis explicações para esse fato, sugerem-se as alterações na atividade da hialuronidase da proteína PH20. Essa proteína situa-se na membrana plasmática do espermatozoide, mais precisamente na porção pós-acrossomal da cabeça, e fornece a esta célula a capacidade de penetrar a camada de células do *cumulus* que envolve o oócito (Florman e Dulcibella, 2006).

A adição de AG pode ter levado a um rearranjo no padrão de expressão superficial da PH20 e, talvez, de outras proteínas da superfície do espermatozoide, o que explica, dessa forma, a mudança no padrão de ligação lateral da cabeça das células espermáticas submetidas à capacitação *in vitro*. Essa hipótese foi confirmada por Myles e Primakoff (1997) ao demonstrarem que as mudanças no padrão de localização de proteínas modificam o ambiente da membrana. O resultado dessa modificação é que a proteína realocada é colocada em contato com um grupo diferente de proteínas da membrana plasmática, que podem tanto ativar, quanto inibir sua função.

Porém, o percentual de oócitos penetrados após a retirada das células de *cumulus* (0,1M AG) foi significativamente mais baixo que o do grupo-controle. Brener et al. (2003) afirmaram que o NO pode influenciar na dinâmica do citoesqueleto, uma vez que esses autores demonstraram que a capacitação *in vitro* de espermatozoides de bovinos, ovinos, ratos e humanos é acompanhada pelo aumento da polimerização de actina tempo dependente, formando actina-F, primeiro na peça intermediária e, depois, na cabeça. Logo, a diminuição na concentração de NO após a adição de AG pode ter evitado a polimerização de filamentos de actina presentes na cabeça e na cauda dos espermatozoides, interferindo na capacitação e na motilidade espermática,

diminuindo, assim, a taxa de penetração. A diminuição na percentagem de espermatozoides bovinos capacitados avaliada pela taxa de penetração em oócitos homólogos também foi observada por Leal et al. (2009) após inibição da síntese de NO, ao utilizar outro fármaco, o L-NAME.

Conclui-se que a inibição da síntese de NO pela AG diminuiu a qualidade espermática durante a capacitação de espermatozoides bovinos *in vitro*, exceto a atividade mitocondrial. Somente a integridade da membrana foi revertida após a adição de NO, sugerindo diferentes vias de ação do NO na qualidade espermática durante a capacitação *in vitro* de espermatozoides bovinos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos do LRMGA (CCTA-UENF) Bruna Lomba Dias, Márcia Resende Faes, João Gomes Siqueira e Fausto Paes de Carvalho, pelo apoio durante o experimento, além dos professores e técnicos do LFBM (CBB-UENF). Este projeto teve o apoio financeiro da FAPERJ e da CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMPc pathway on bovine oocyte meiotic resumption *in vitro*. *Theriogenology*, v.68, p.693-701, 2007.
- BOVERIS, A.A.; COSTA, L.; CADENAS, E. et al. Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen, and nitric oxide. *Methods Enzymol.*, v.301, p.188-198, 1999.
- BRACKETT, B.G.; COFORRE, M.A.; BOICE, M.L. et al. Use of zona-free hamster ova to assess the sperm fertilizing ability of bull and stallion. *Gamete Res.*, v.5, p.217-227, 1982.
- BRENER, E.; RUBISTEIN, S.; COHEN, G. et al. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.*, v.68, p.837-845, 2003.
- CHAMBERLAND, A.; FOURNIER, V.; TARDIF, S. et al. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology*, v.55, p.823-835, 2001.

- DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.*, v.2, p.48-54, 1997.
- FLORMAN, H.F.; DULCIBELLA, T. Fertilization in Mammals. In: NEIL, J.D. (Ed.). *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*. San Diego: Academic, 2006. p.55-112.
- FRANCAVILLA, F.; SANTUCCI, R.; MACEROLA, B. et al. Nitric oxide synthase inhibition in human sperm affects sperm-oocyte fusion but not zona pellucida binding. *Biol. Reprod.*, v.63, p.425-429, 2000.
- HELLSTRON, W.J.G.; BELL, M.; WANG, R.Y. et al. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation. *Fertil. Steril.*, v.61, p.1117-1122, 1994.
- HERRERO, M.B.; CEBRAL, E.; BOQUET, M. et al. Effect of nitric oxide on mouse sperm hyperactivation. *Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.*, v.44, p.65-69, 1994.
- HERRERO, M.B.; GOIN, J.C.; BOQUET, M. et al. The nitric oxide synthase of mouse spermatozoa. *FEBS Lett.*, v.411, p.39-42, 1997.
- LEAL, A.C.M.S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C.; PAES DE CARVALHO, C.S. et al. The role of nitric oxide in the quality of fresh bovine spermatozoa during heparin-induced capacitation *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, v.116, p.38-49, 2009.
- MANUAL para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- MATTA, S.G.C.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C.; VIANA, K.S. et al. Effects of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the *in vitro* maturation of oocyte-cumulus complexes of cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.111, p.189-201, 2009.
- MEISER, H.; SCHULZ, R. Detection and localization of two constitutive NOS isoforms in bull spermatozoa. *Anat. Histol. Embryol.*, v.32, p.321-325, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol.*, v.65, p.55-63, 1983.
- MYLES, D.G.; PRIMAKOFF, P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol. Reprod.*, v.56, p.320-327, 1997.
- NAKAMURA, Y.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. et al. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biol. Reprod.*, v.67, p.1588-1592, 2002.
- O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.B.; BECONI, M.T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology*, v.52, p.289-301, 1999.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A. et al. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, v.38, p.1171-1180, 1988.
- PAES DE CARVALHO, C. S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C.; CARVALHO, F. P. et al. Efeito do óxido nítrico na capacitação *in vitro* induzida ou não pela heparina em espermatozoides bovinos. *Acta Sci. Vet.*, v.31, p.516, 2003.
- RODRIGUEZ, P.C.; O'FLAHERTY, C.M.; BECONI, M.T. et al. Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 85, p. 231-242., 2004.
- ROSSELLI, M.; DUBEY, R.K.; IMTHURN, B. et al. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Hum. Reprod.*, v.10, p.1786-1790, 1995.
- SENGOKU, K.; TAMATE, K.; TAKAODA, T. et al. Effects of low concentration of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, v.69, p.522-527, 1998.
- SRIVASTAVA, S.; DESAI, P.; GOVIL, G. Mechanism of action of L-arginine on the vitality of spermatozoa is primarily through increased biosynthesis of nitric oxide. *Biol. Reprod.*, v.74, p.954-958, 2006.
- THOMAS, D.D.; RIDNOUR, L.A.; ISENBERG, J.S. et al. The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, v.45, p.18-41, 2008.

THORNALLEY, P.J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.419, p.31-40, 2003.

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

YEOMAN, R.R.; JONES, W.D.; RIZK, B.M. Evidence of nitric oxide regulation of hamster sperm hyperactivation. *J. Androl.*, v.19, p.58-64, 1998.

ZAMIR, N.; BARKAN, D.; KEYNAN, N. et al. Atrial natriuretic peptide induce acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am. J. Physiol.*, v.269, p.216-221, 1995.