

Alessandra Cunha Brandão

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

São Paulo

2008

Alessandra Cunha Brandão

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

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

Departamento
Reprodução Animal

Área de concentração
Reprodução Animal

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

Co-orientador
Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

São Paulo

2008

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

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

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

São Paulo, 22 de agosto de 2007

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRANDÃO, Alessandra Cunha

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

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

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

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

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

Sperm motility depends on energy consumption. In some species sperm mitochondria play an important role in the production of energy for tail activity. Low-level laser irradiation increases this production as a modulation tool. The objective of this study was to analyze the effect of a continuous 650 nm wavelength diode laser irradiation, with dose 6 J/cm² for 120s, in the motility, plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential in fresh and frozen equine spermatozoa. Five ejaculates were obtained from five stallions (n=25). Semen was packaged into 0.5mL straws with 200x10⁶ cells/mL in a Botu-CrioTM (Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Botucatu, Brazil) and frozen by automated technique using a programmed machine (TK3000[®], TK Tecnologia em Congelação-Ltda, Uberaba, Brazil). Fresh samples were divided in two groups: spermatozoa treated with laser and without laser (non treated spermatozoa), and frozen samples in three groups: spermatozoa treated with laser before freezing; spermatozoa treated with laser after thawing and without laser (cryopreserved spermatozoa). Cryopreserved samples were analyzed immediately after thawing (time 0) and two hours after thawing (time 2). Motility was evaluated by computer assisted sperm analysis (CASA, Ivos-Ultimate of Hamilton Thorne Biosciences), plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential were evaluated by flow cytometry (FACSaria-Beckton-Dickeson, San Jose, USA). The data were analyzed by the SAS program, at a 5% level. Beat cross frequency (BCF) test was higher (p<0.05) for fresh semen group treated with laser (34.8 ± 0.7%) as compared to non treated group (without Laser - 33.4 ± 0.8%). At time zero, mitochondrial membrane potential was lower in laser treatment before freezing group (40.7 ± 1.5%); compared to without laser treatment group (cryopreserved spermatozoa - 47.4 ± 2.4%) (P<0.05). Two hours after thawing, plasma and acrosomal integrity was higher (P<0.05) in the group were spermatozoa were treated with laser before freezing (8.3 ± 0.7%) compared with the group without laser treatment

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

