

**Efeito das enzimas óxido nítrico sintase endotelial e induzível
na capacitação *in vitro* induzida pela heparina de
espermatozóides bovinos *in natura***

FERREIRA-BERBARI, J. B. P.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Professor (a) orientador (a): Maria Clara Caldas Bussiere
Julho de 2008

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o papel das isoformas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) durante a capacitação *in vitro* de espermatozóides bovinos (5 h), utilizando-se diferentes concentrações do inibidor da iNOS, aminoguanidina (AG) (0,001, 0,01 e 0,1 M) e de ácido retinóico (AR) (1, 10, 100 e 1000 μ M), um inibidor da eNOS, ao meio de capacitação *in vitro* induzida pela heparina, e nitroprussiato de sódio (SNP), doador de NO (500 μ M) à concentração que apresentou efeito deletério (0,1 M e 1000 μ M, respectivamente). O inibidor da síntese do GMPc, 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a]-quinixalina-1-one (ODQ - 10 μ M) foi adicionado ao longo da capacitação para verificar a via de ação do NO. A motilidade e o vigor foram avaliados de maneira subjetiva por meio de microscopia de luz indireta, e a integridade de membrana plasmática foi avaliada por meio da coloração vital com azul de Tripán (2%). A adição de 0,1 M de AG diminuiu a motilidade e o vigor a partir dos 15 minutos, quando comparada ao controle e às demais concentrações ($P < 0,05$), chegando à ausência de movimento a partir dos 120 minutos. A adição de 500 μ M de SNP a 0,1 M AG reverteu a motilidade e o vigor apenas nos primeiros 15 e 60 minutos, respectivamente. As concentrações de AG utilizadas (0,001, 0,01 e 0,1 M) diminuiram o percentual de espermatozóides com membrana plasmática íntegra comparando-se ao controle ($P < 0,05$). Contudo, a adição de SNP à concentração de 0,1M de AG levou ao aumento de 83,3% neste parâmetro quando comparada ao uso exclusivo do inibidor. A

utilização de 1000 μM de AR no meio de capacitação *in vitro* de sêmen fresco bovino, diminuiu a motilidade progressiva e o vigor espermático ($P < 0,05$). A integridade de membrana plasmática diminuiu quando se utilizou 1000 μM em relação ao controle e às demais concentrações (1, 10 e 100 μM), que também diferiram do controle ($P < 0,05$). A adição de SNP não reverteu os efeitos da adição de AR na motilidade e no vigor, porém houve um aumento (10 e 45%) no percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, quando comparada ao controle e 1000 μM de AR, respectivamente. A adição de ODQ não influenciou a motilidade e o vigor, contudo aumentou a integridade de membrana em 11% em relação ao controle. A atividade mitocondrial foi verificada por meio do teste do MTT (sal brometo de difeniltetrazolium 3-[4,5-dimetiltrazol-2-yl]-2,5), e a capacitação espermática foi observada por meio do teste de penetração em oócitos homólogos. A adição de AG não influenciou a atividade mitocondrial. Houve uma diminuição ($P < 0,05$) na percentagem de penetração de espermatozoides tratados com 0,01 e 0,1 M de AG (20,26 e 100%, respectivamente) em relação ao controle ($P < 0,05\%$). Porém, ao utilizar-se oócitos desnudos acrescidos de espermatozoides com 0,1M de AG, observou-se um aumento de 15%. Já a adição de AR levou a diminuição progressiva na atividade mitocondrial quando adicionados 100 e 1000 μM de AR (38,84 e 71,73%, respectivamente), quando comparada ao controle ($P < 0,05$). Houve uma diminuição ($P < 0,05$) na percentagem de penetração de espermatozoides tratados com 100 e 1000 μM de AR (16,61 e 100%, respectivamente) em relação ao controle. Contudo, a percentagem de oócitos desnudos penetrados com espermatozoides capacitados em presença de 1000 μM de AR aumentou 5% o percentual de oócitos penetrados. Conclui-se que: 1) a inibição da síntese de NO pela iNOS e eNOS diminuiu a motilidade progressiva, o vigor espermático, a integridade de membrana plasmática e a capacitação *in vitro*, porém apenas o AR diminuiu a atividade

mitocondrial; 2) somente a integridade de membrana foi revertida pela a adição de NO, demonstrando diferentes mecanismos de ação do NO na qualidade espermática ao longo da capacitação; 3) a via utilizada pela eNOS na motilidade, no vigor e na integridade de membrana é uma via independente do GMPc/NO; 4) a integridade de membrana é modulada pela ação do NO e uma pequena parte pela via GMPc.

Palavras-chave: óxido nítrico, qualidade seminal, bovino, capacitação *in vitro*, aminoguanidina, ácido retinóico.

Autor (a): Janaína Barcelos Porto Ferreira-Berbari

Email: jbarcelos@uol.com.br