



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

ANDRÉIA SANTANA BEZERRA

-
EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ADENOSINA NO SÊMEN
RESFRIADO DE OVINOS

BELÉM - PA

2019

ANDRÉIA SANTANA BEZERRA

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ADENOSINA NO SÊMEN
RESFRIADO DE OVINOS

Dissertação de mestrado apresentado à Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Erick Fonseca de Castilho

BELÉM-PA

2019

Bezerra, Andréia Santana

Efeito de diferentes concentrações de adenosina no sêmen resfriado de ovinos/ Andréia Santana Bezerra. – Belém, PA, 2019. 55 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Rodrigues.

1. Ovinos – Semen Resfriado. 2. Adenosina - Adição. Metabólitos Reativos do Oxigênio - ROS. 4. Reprodução Animal. 5. Viabilidade Espermática – Ovinos. I. Rodrigues, Luiz Fernando de Souza (orient.) II. Título.

CDD – 636.390821

ANDRÉIA SANTANA BEZERRA

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ADENOSINA NO SÊMEN
RESFRIADO DE OVINOS**

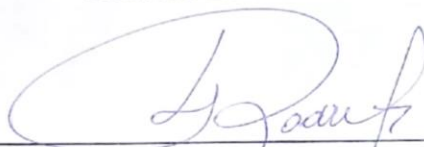
Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na
Amazônia para a obtenção do título de Mestre, área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. D.S.c. Luiz Fernando de Souza Rodrigues

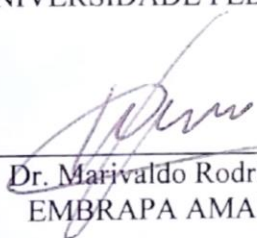
Co-orientador: Prof. D.S.c. Erick Fonseca de Castilho

Aprovado em 14 / 01 / 19.

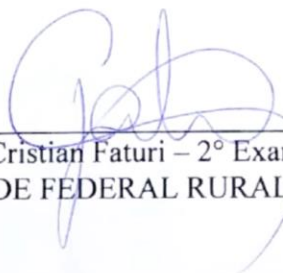
BANCA EXAMINADORA



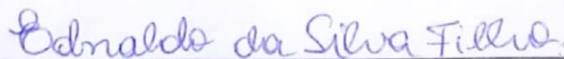
Dr. Luiz Fernando de Souza Rodrigues - Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



Dr. Marivaldo Rodrigues Figueiró - 1º Examinador
EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL/BELÉM



Dr. Cristian Faturi - 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



Dr. EDNALDO DA SILVA FILHO - 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

AGRADECIMENTOS

A cima de tudo, eu agradeço a Deus, por ter estado sempre comigo, me iluminando e me dando forças para prosseguir.

Aos meus pais José Nilson Bezerra e Lucidéia Bezerra, que sempre me apoiaram e me subsidiaram para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao meu amado esposo Jean Silva que tem sonhado comigo e sido meu alicerce.

Ao meu irmão, André Bezerra, por todo encorajamento.

Ao meu orientador, Luiz Fernando de Souza Rodrigues, que me recebeu com todo carinho, por sua paciência, cuidado e por todo conhecimento repassado.

Ao meu co-orientador, Erick Fonseca de Castilho, por todo tempo dedicado me orientando e me ensinando em tudo que eu necessitava para desenvolver esta pesquisa.

À minha querida amiga, Thialla Nascimento, por ter estado sempre comigo, por ter sido um anjo na minha vida e, por ter sido essencial na execução desta pesquisa.

À toda a família CPCOP, estagiários (Larissa, Sillas, Aline, Renata, Fernada, Lívia, Leonam, Karol, Marcus, Rafaele, Mayrla, Bárbara, Rafaela, Johnny, Carlos, Letícia, Raqueline, Gabriel e Felipe), e funcionários e técnicos (Dona Martinha, Ana Paula, Seu Raimundo, Seu Evandro, Dona Dalva) pela amizade, por terem contribuído de alguma forma com este trabalho e por todos os bons momentos que passamos juntos.

Ao secretário da Pós-graduação, Jayme, por sempre se dispor em nos ajudar e pela paciência.

À banca examinadora, por todas as contribuições feitas a este trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro,

A todos vocês muito obrigada!

“Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós...”, meu Deus todo poderoso Jesus!

Ao meu amado esposo Jean Silva, meus pais José Nilson e Lucidéia Bezerra e ao meu irmão André Bezerra.

Dedico!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Redução tetravalente do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria até a formação de água (H ₂ O). Várias espécies reativas de O ₂ são formadas no processo.....	13
Figura 2 - Papel da Adenosina e seus receptores na capacidade fertilizante dos espermatozoides.....	18
Figura 3 - Motilidade progressiva retilínea em cada tempo de resfriamento em função das concentrações de adenosina.....	39
Figura 4 - Motilidade progressiva retilínea de cada nível de adenosina em função do tempo de resfriamento.....	40
Figura 5 - Teste supravital e vigor espermático em função das concentrações de adenosina.....	41
Figura 6 - Teste supravital e vigor espermático em função do tempo de resfriamento.....	42

RESUMO

A adenosina foi reportada na medicina humana causando melhorias na peroxidação lipídica das células, assim a adição deste nucleosídeo ao sêmen resfriado de ovinos poderia trazer efeitos positivos durante o resfriamento. Portanto, o estudo objetivou avaliar o potencial da adição da adenosina, bem como o melhor nível deste nucleosídeo sobre a viabilidade espermática de ovinos em diferentes tempos de incubação a 5 °C. Foram utilizados seis carneiros adultos da raça Santa Inês, dos quais foram coletados seis ejaculados, totalizando 36 repetições de cada tratamento. O delineamento foi em blocos e esquema fatorial 5 x 4, (5 níveis de adição de adenosina e 4 tempos de resfriamento) e, efeito do animal e de coleta. Após o exame físico do sêmen, realizou-se a diluição com o diluidor Andromed® (controle), Andromed® + 0,5 % adenosina, Andromed® + 0,75 % adenosina, Andromed® + 1 % de adenosina, Andromed® + 1,5 % de adenosina. As amostras foram retiradas do resfriamento após 4, 8, 12 e 16 horas e avaliadas pela motilidade, vigor espermático e integridade estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides obtida pelo teste supravital (SV). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com posterior diferença de médias pelo teste de Tukey e análise de regressão, a nível de 5 % de probabilidade. Verificou-se o efeito da interação dos fatores níveis de adenosina e tempos de resfriamento para a variável motilidade progressiva retilínea. Após 8 horas de resfriamento todos os níveis de adenosina mostraram-se médias superiores ($P \leq 0,05$) da motilidade em relação ao controle, estando somente o nível de 0,75 % do nucleosídeo, dentro deste tempo de resfriamento, de acordo com padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. A análise de regressão demonstrou efeito quadrático da motilidade retilínea progressiva em função dos níveis de adenosina para cada tempo de resfriamento estudado, com concentrações recomendadas de 0,81 e 1,04 % de adenosina com 4 horas 8 horas, respectivamente. A adenosina também promoveu efeito protetivo até 16 horas de resfriamento sobre a integridade estrutural da membrana plasmática com a adição das concentrações 0,5 e 0,75 %.

Palavras-chave: Reprodução animal. Estresse oxidativo. Nucleosídeo purinérgico.

ABSTRACT

Adenosine has been reported in human medicine causing improvements in the lipid peroxidation of cells, so the addition of this nucleoside to the cooled semen of sheep could bring positive effects during cooling. Therefore, the objective of this study was to evaluate the potential of adenosine addition as well as the best level of this nucleoside on the sperm viability of sheep at different incubation times at 5 ° C. Six adult sheep of the Santa Inês breed were used, from which six ejaculates were collected, totaling 36 replicates of each treatment. The design was in blocks and factorial scheme 5 x 4, (5 levels of addition of adenosine and 4 cooling times), and animal and collection effect. After the physical examination of the semen, dilution with the diluent Andromed® (control), Andromed® + 0.5% adenosine, Andromed® + 0.75% adenosine, Andromed® + 1% adenosine, Andromed® + 1.5% adenosine. The samples were withdrawn from the cooling after 4, 8, 12 and 16 hours and evaluated by motility, spermatic vigor and structural integrity of sperm plasma membrane by Supravital test (SV). The data were submitted to analysis of variance with Tukey test and regression analysis, at a level of 5% of probabilities. The effect of the interaction of factors adenosine levels and cooling times on the variable rectilinear progressive motility was verified. After 8 hours of cooling, all adenosine levels were higher ($P \leq 0.05$) to the motility in relation to the control, being only the level of 0.75 % of the nucleoside, within this cooling time, according to standards advocated by the Brazilian College of Animal Reproduction. The regression analysis showed a quadratic effect of progressive rectilinear motility in function of adenosine levels for each cooling time studied, with recommended concentrations of 0.81 % 1.04 % of adenosine at 4 hours and 8 hours, respectively. Adenosine also promoted a protective effect up to 16 hours of cooling on the structural integrity of the plasma membrane with the addition of 0.5 and 0.75% concentrations.

Keywords: Animal reproduction. Oxidative stress. Purinergic nucleoside.

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	9
1.1. Objetivos	10
1.2. Resfriamento do sêmen	10
1.3. Metabólitos reativos do Oxigênio (ROS) e efeito nos espermatozoides	12
1.4. Diluidores e crioprotetores	15
1.5. Adenosina	16
REFERÊNCIAS	20
2. CONCENTRAÇÕES DE ADENOSINA SOBRE A VIABILIDADE DO SÊMEN RESFRIADO DE OVINOS	28
2.1. Introdução	29
2.2. Material e Métodos	31
2.3. Resultados	37
2.4. Discussão	42
2.5. Conclusão	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXO	55

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Dentre as biotécnicas reprodutivas realizadas em ovinos, a inseminação artificial destaca-se por promover menores custos e melhores resultados (BICUDO et al., 2003), além de contribuir para o melhoramento genético do rebanho e facilitar o controle do manejo reprodutivo (ALLAI et al., 2015).

O sêmen resfriado é utilizado na inseminação artificial de ovinos nas diferentes vias como, transcervical (KING et al., 2004), cervical (PALACÍN et al. 2012; FORNAZARI et al., 2018) e laparoscópica (AKÉ-VILLANUEVA et al., 2017; SILVA-MEIRELLES et al. 2017). No entanto, o processo de resfriamento do sêmen ocasiona decréscimo da qualidade e diminuição da sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea, o que pode estar relacionado a um aumento da perda embrionária, decrescendo a taxa de prenhez (O'HARA et al., 2010).

Adicionalmente, o processo oxidativo, que é a liberação de intermediários químicos reativos oriundos do metabolismo do oxigênio (MAIA e BICUDO, 2009), provoca lesão na membrana plasmática dos espermatozoides e pode ser agravada pelo resfriamento do sêmen (ZALATA e DEPUYDT, 1998). Estes metabólitos são chamados de espécies reativas ao oxigênio (ROS- Reactive Oxygen Species) (MAXWELL e WATSON, 1996).

A literatura descreve nucleotídeos e nucleosídeos como participantes das funções do sistema genital masculino, e propõe a presença de receptores de purinas na superfície celular deste sistema. Estas funções estariam relacionadas com o controle da fertilidade e reprodução (BURNSTOCK, 1978; FREDHOLM et al. 1994; 1996).

Portanto, o uso de um nucleosídeo purinérgico poderia agir de forma benéfica na conservação seminal, por resfriamento, para a manutenção e prolongamento da qualidade seminal, visando maior flexibilidade no momento da inseminação artificial, bem como aumento na taxa de prenhez. Da mesma forma, esta substância poderia atuar diminuindo as lesões espermáticas em decorrência da ação dos radicais livres provenientes do metabolismo normal das células e do processo de criopreservação.

Deste modo, a melhoria da viabilidade espermática poderá subsidiar não somente os programas de inseminação artificial, mas também, os de transferência de embriões, produção *in vitro* de embriões e outras biotécnicas da reprodução animal.

1.1.Objetivo

Verificar o potencial da adição de diferentes concentrações de adenosina sob a viabilidade do sêmen resfriado de ovinos, em diferentes tempos de resfriamento a 5 °C.

1.2.Resfriamento do sêmen

Resfriamento do sêmen é o processo que compreende desde o intervalo de temperatura ambiente até 5 °C (WATSON, 2000), com redução gradativa de temperatura para preservar a viabilidade dos espermatozoides e evitar danos as células (WATSON, 2000). Com este processo ocorre o fenômeno de transição da membrana plasmática do estado líquido para o estado gel (WATSON, 2000).

O decréscimo da qualidade do sêmen segue juntamente com a diminuição da sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea e podem estar relacionados a um aumento da perda embrionária; logo, a taxa de prenhez após a inseminação artificial decresce (O'HARA et al. 2010). O processo de resfriamento também pode reduzir a capacidade de migração de espermatozoides através da cérvix e a motilidade destes com deslocamento linear na tuba uterina da fêmea ovina (DRUART et al., 2009).

Os resultados obtidos na inseminação artificial com sêmen resfriado ou fresco são superiores aos obtidos com sêmen congelado, tanto com o emprego da IA transcervical (SALAMON & MAXWELL, 1995), quanto com a utilização de IA por laparoscopia (DONOVAN et al., 2004). E ainda, quando a inseminação é realizada no local, o sêmen refrigerado é prático em relação ao manejo, e destaca-se em relação ao sêmen congelado, haja vista que o último utiliza ferramentas onerosas e evasivas por envolvem, na maioria das vezes, a via laparoscópica, além de requerer pessoal mais treinado para a realização da técnica (FALCHI et al. 2018).

Adicionalmente, as baixas temperaturas que o sêmen resfriado é submetido, quando conservado com diluente, mantem a viabilidade dos espermatozoides por um maior período em relação ao sêmen fresco, em virtude da redução do metabolismo dos espermatozoides e diminuição crescimento microbiano (KATILA, 1997).

Contudo, o processo de resfriamento do sêmen possui suas limitações, como: queda da produção de energia dos espermatozoides, redução da motilidade, aumento da permeabilidade da membrana plasmática, com perda de íons e de moléculas intracelulares, bem como aumento do número de espermatozoides com movimento circular (SIQUEIRA, 2006).

Outro fator a ser considerado é o choque térmico durante o resfriamento, que pode danificar as células a diferentes níveis estruturais (SUCCU et al. 2011); além disso, o aumento do tempo de armazenamento pode agravar esses danos. Deste modo, estes acontecimentos acabam deteriorando a qualidade espermática, além de provocar modificações severas na morfologia e em estruturas funcionais, comprometendo a fertilidade reprodutiva (FALCHI et al. 2018).

Para prevenir a perda excessiva de água e a formação de cristais durante o processo de criopreservação do sêmen, os espermatozoides necessitam de um resfriamento lento. Neste processo o intervalo de temperatura entre 15 e 5 °C é considerado crítico em virtude do choque térmico (WATSON 2000).

O resfriamento do sêmen também provoca mudanças na conformação da membrana plasmática dos espermatozoides, ocasionando rearranjos anormais dos fosfolipídios e proteínas (AMANN e PICKETT, 1987; SANTOS, 2003). Uma categoria desses fosfolipídios, que assumem uma forma cônica com base hidrofóbica, são os ácidos graxos poli-insaturados. Por causa da forma cônica, esses fosfolipídios formam uma micela invertida, ou forma “hexagonal II” (PARKS e GRAHAM, 1992; VALLE e SILVA FILHO, 2001).

Este rearranjo não afeta a membrana plasmática dos espermatozoides em baixas temperaturas, no entanto, quando há o processo de reaquecimento, os fosfolipídios poli-insaturados formadores de micela invertida agregados podem desestabilizar a membrana e permitir a ocorrência da forma “hexagonal II”. Este evento levaria a perda da integridade da membrana, em virtude da perturbação desta, além de promover a formação de canais hidrofílicos na membrana que permitiria a passagem de íons e pequenas moléculas, ocasionando a perda do controle osmótico (PARKS e GRAHAM, 1992; PARKS, 1997; VALLE e SILVA FILHO, 2001).

A sensibilidade dos espermatozoides submetidos ao resfriamento com longos períodos de estocagem está relacionado ao aumento da relação de ácidos graxos insaturados/saturados na composição de fosfolipídios da membrana citoplasmática, fato este que contribui para as perdas de colesterol e provoca diminuição da estabilidade e resistência ao estresse (WHITE, 1993).

O sêmen resfriado tem sido objeto de estudo em diversas espécies, como: bovina (MURPHY et al. 2018), equina (TRENTIN et al. 2017; AFFONSO et al. 2017), caprina (PEIXOTO et al. 2017), suína (VAKANJAC et al. 2017), asinina (CARVALHO et al. 2017) e ovina (KASIMANICKAM et al. 2011; GHELLER et al. 2018; FALCH et al. 2018). Estes

estudos visam, principalmente, encontrar técnicas para manutenção da qualidade espermática para o sucesso da fertilidade na realização da inseminação artificial.

Neste contexto, o foco destes trabalhos tem sido meios para aumentar o tempo de armazenamento, aplicação de substâncias com potencial antioxidantes e com outras propriedades aos meios diluentes, verificação de melhores temperaturas de resfriamento, melhor concentração espermática por dose, e análises de diferentes diluentes.

Pretendendo verificar o efeito do armazenamento do sêmen de ovinos por 96 horas, Falchi et al. (2018) concluíram que a estocagem a 4 °C diminui progressivamente a qualidade dos parâmetros seminais preditivos, e isso ocorre a partir de 24 horas em diante, sem comprometer a integridade do DNA.

Para minimizar os danos advindos da ação da curva de resfriamento lento que está entre 19 a 8 °C, alguns autores têm testado a ação de diferentes diluentes no resfriamento seminal como aqueles a base de lipídios (gema de ovo), lipoproteínas (leite) (GRAHAM, 1996), bem como substâncias adicionadas à esses diluentes.

Deste modo, adicionando gelatina a um diluidor a base de leite para o resfriamento do sêmen ovino a 5°C, Gheller et al. (2018) concluíram que esta substância melhorou a motilidade e integridade acrossomal de espermatozoides ovinos por um período de 72 horas.

Avaliado o efeito de diferentes diluidores no sêmen resfriado ovino, Kasimanickam et al. (2011) verificaram que o diluidor a base de soja demonstrou ser mais apropriado para substituir outros preparados com fontes de origem animal, uma vez que existe uma preocupação envolvendo a contaminação microbiana dos produtos utilizados como: leite, gema de ovo.

1.3. Metabólitos reativos do Oxigênio (ROS) e efeito nos espermatozoides

O metabolismo normal das células promove a liberação de metabólitos chamados de espécies reativas ao oxigênio (ROS- Reactive Oxygen Species). Este processo é conhecido como estresse oxidativo (MAXWELL e WATSON, 1996) e acaba lesionando a membrana plasmática (ZALATA e DEPUYDT, 1998). Os ROS são intermediários químicos reativos oriundos do metabolismo do oxigênio, sendo aqueles mais comuns gerados pelo espermatozoide: o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^\bullet) e, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MAIA e BICUDO, 2009).

Este metabolismo celular aeróbico ocorre de forma normal quando o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente promovendo a adesão de quatro elétrons formando

H₂O, com formação de vários metabólitos durante este processo (MAIA e BICUDO, 2009) (Figura 1).

Dentre as principais espécies reativas ao oxigênio, o ânion superóxido (O₂⁻) pode ser caracterizado como um radical livre que tem sua formação, gerada de forma espontânea na membrana mitocondrial, pelo oxigênio molecular, com a adição de um elétron. Ele age somente onde é produzido, não tendo capacidade de penetrar nas camadas lipídicas (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Por outro lado, o radical hidroxila (OH•) é considerado o mais reativo, capaz de causar mais danos dentre os ROS. Sua formação se dá por meio do peróxido de hidrogênio com reação catalisada por íons metais (Fe⁺⁺ ou Cu⁺), a qual é denominada de reação de Fenton (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG e ARNÉR, 2001). Já o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) não é um radical livre, todavia é destrutivo por ser um intermediário na reação que promove a formação do radical OH• (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NORDBERG e ARNÉR, 2001).

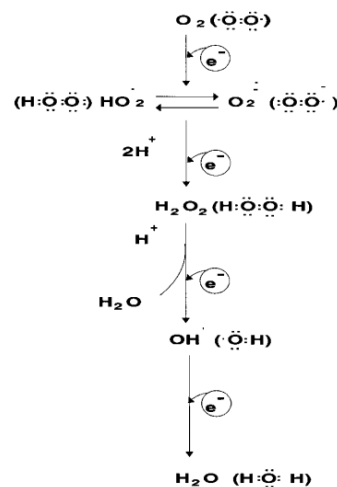


Figura 1 – Redução tetravalente do oxigênio molecular (O₂) na mitocôndria até a formação de água (H₂O). Várias espécies reativas de O₂ são formadas no processo. (Adaptado de Cohen, 1989).

Existem dois mecanismos independentes que promovem a produção de ROS. O primeiro está relacionado com um sistema enzimático presente na membrana plasmática dos espermatozoides, o qual utiliza como substrato NAD(P)H oxidase. O segundo é o principal gerador de metabólitos e envolve a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, haja vista que a mitocôndria é a principal fonte de estresse oxidativo, sendo o superóxido [O₂] produzido continuamente em decorrência da respiração (DA SILVA, et al. 2011).

O estresse oxidativo está ligado a diversos fatores que comprometem a qualidade seminal, tais quais: redução na motilidade dos espermatozoides (AITKEN et al. 2004), diminuição da fluidez e integridade da membrana plasmática (BAUMBER et al. 2000), mudanças nas funções mitocondriais (DA SILVA et al. 2011), alterações na cromatina (BURNAUGH et al. 2007), danos no sistema enzimático antioxidante (GRIVEAU et al. 1995) e na membrana acrossomal (MARQUES et al. 2002). Em virtude destes acontecimentos, a fertilidade é afetada, pois os espermatozoides ficam impossibilitados de fertilizar o ovócito (DU PLESSIS et al. 2010; RAO e GANGADHARAN, 2008), resultando em baixos índices reprodutivos.

Apesar de altas produções de ROS serem prejudiciais aos espermatozoides, esses metabólitos em níveis fisiológicos são essenciais para a capacitação, hiperativação e reação de acrossoma, devendo haver um equilíbrio entre a produção e os mecanismos de eliminação para uma adequada capacidade fertilizante (FALCHI et al., 2018).

Em gametas humanos (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1993; AITKEN, 1995), bovino (O'FLAHERTY et al., 2003) e equino (BAUMBER et al., 2003) foi constatada a necessidade de pequenas quantidades do ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio para o processo de capacitação espermática, hiperativação da motilidade, reação acrossomal e fusão dos gametas.

O espermatozoide possui um sistema enzimático de defesa antioxidante. Deste sistema fazem parte superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) e ainda, ácido ascórbico e α -tocoferol, os quais são antioxidantes não enzimáticos (AITKEN, 1995a).

O plasma seminal se encarrega de proteger o espermatozoide no meio extracelular contra danos causados pelas ROS proveniente dele próprio e por fagócitos presentes no ejaculado (AITKEN, 1995). Este plasma contém redutores de ROS, sendo estes enzimáticos e não enzimáticos, dentre os quais estão: ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, SOD, glutathione e outros tiois, taurina, hipotaurina e vitamina E (JÓZWIK et al., 1997; OVERVELD et al., 2000; ZINI et al., 2000).

Normalmente, os danos nas células ocorrem pelo desequilíbrio entre a quantidade de ROS gerada e a retirada pelo sistema antioxidante, provocando o estresse oxidativo da célula, pois o sistema não consegue eliminar o excesso de ROS (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Os ROS provenientes de danos nas mitocôndrias promovem a liberação de proteínas pré-apoptóticas como citocromo C, necessárias para o transporte de elétrons. Entretanto,

quando em excesso, os metabólitos aumentam a quantidade de citocromo C, o qual passa a funcionar como ativador de morte celular (MISHRA e SHANA, 2005).

Os espermatozoides passam por este fenômeno durante o longo armazenamento no resfriamento e criopreservação, uma vez que sua membrana é sensível pela presença de ácidos graxos poli-insaturados (VISHWANATH e SHANNON, 1997; ZALATA e DEPUYDT, 1998; BANSAL e BILASPURI, 2010). A membrana plasmática de espermatozoides ovinos acaba sofrendo ainda mais a esse estresse, quando comparado com outras espécies, pois são mais sensíveis a peroxidação fosfolipídica de membrana com grande produção de ROS (MUIÑO-BLANCO et al., 2008).

A diluição do sêmen feita antes da criopreservação também é outro fator que agrava a produção de ROS's, pois o sêmen acaba perdendo qualidade, uma vez que o plasma seminal que conteria os componentes necessários para a proteção dos espermatozoides, como antioxidantes, passaria a estar em menor quantidade com a diluição (PEÑA et al., 2009). Espermatozoides morfologicamente anormais e danificados pelo processo de criopreservação estariam mais propensos ao estresse oxidativo, pela maior produção de ROS (BALL e VO, 2001).

1.4. Diluidores e Crioprotetores

Um bom diluidor para o sêmen ovino deve possuir características como, fornecer nutrientes necessários para os espermatozoides; ter capacidade tampão; promover um ambiente isotônico (300 mOsm/L), com pequena variação na tonicidade do diluidor, mantendo esta igual a do plasma seminal; proporcionar proteção aos espermatozoides contra choque térmico durante o resfriamento; proteger a membrana plasmática dos espermatozoides durante a congelação e descongelação; agir contra a ação microbiana e; proteger os espermatozoides para que este preserve ao máximo sua capacidade fertilizante (MAIA, 2010).

Dentre os compostos utilizados na conservação seminal está a glicose e frutose (fonte de energia); meio Tris, citrato de sódio ou tampão fosfato (componente tampão); gema de ovo ou leite (protetores contra choque térmico); glicerol (crioprotetor) e os antibióticos (agentes antimicrobianos) (MAIA, 2010).

Os crioprotetores tem a finalidade de proteger os espermatozoides na congelação e descongelação, devendo ser adicionados aos diluentes (AMANN & PICKET, 1987). Quando a ação crioprotetora ocorre dentro da célula, a atuação é de crioprotetores penetrantes. Por

outro lado, a atividade de crioproteção fora da célula ou em sua superfície é realizada por crioprotetores não penetrantes (BITTENCOURT et al. 2013).

A proteção contra o choque frio, proveniente do resfriamento, e injúrias na membrana plasmática dos espermatozoides, causada pelo processo de congelação/descongelação, é realizada por crioprotetores não penetrantes, dos quais fazem parte açúcares, lipoproteínas, lipoproteínas de baixa densidade e fosfolípidios, presentes na gema do ovo e leite (SALAMON e MAXWELL, 2000; STORNELLI et al., 2005; BITTENCOURT, 2013).

Na prevenção de cristais de gelo, com proteção de estruturas celulares tanto intra como extracelular, atuam os crioprotetores penetrantes, como o glicerol. No entanto, a pesar do glicerol ser utilizado na criopreservação do sêmen ovino, alguns estudiosos apontam para efeitos prejudiciais desta substância, tais quais, estresse osmótico, mudanças na organização, fluidez, permeabilidade e desorganização da composição lipídica da membrana plasmática, gerando problemas na viabilidade e fertilidade após descongelamento (BITTENCOURT et al., 2013).

Alguns crioprotetores têm sido citados na literatura como protetores contra os efeitos deletérios do resfriamento do sêmen ovino. Como, por exemplo, os a base de gema de ovo, que além de proteger contra o choque térmico, atua também na proteção durante o congelamento e descongelamento. Assim como o leite integral, desnatado e constituído que em virtude de sua fração proteína pode agir como tampão contra mudanças de pH e como um agente quelante contra qualquer metal pesado (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Estudos têm sido feitos com o sêmen resfriado testando diferentes diluentes, como por exemplo, os a base de gema de ovo, leite, lecitina de soja, glicina, citrato e tris (MILCZEWSKI et al., 2000; KASIMANICKAM et al. 2011). Bem como, a adição de substâncias com potencial antioxidante ao sêmen resfriado de diversas espécies (CAMPUZANO et al., 2014; AFFONSO et al. 2017; COSTA et al. 2017).

1.5. Adenosina

A adenosina é um nucleosídeo purinérgico presente tanto no meio intra como no meio extracelular e desempenha um papel fundamental como neuromodulador e no controle da homeostase (CUNHA, 2001). Este nucleosídeo é formado por uma ligação glicosídica entre uma base púrica adenina e uma D-ribose (POLOSA, 2002; POLOSA e HOLGATE, 2006). Esta é gerada a partir do metabolismo do trifosfato de adenosina (ATP) pela ação de enzimas da família das ecto-nucleotidases, amplamente distribuídas pelo organismo e expressas em

muitas células incluindo plaquetas, células epiteliais, endoteliais e leucócitos (ELTZSCHIG, 2009).

A adenosina tem sido amplamente estudada no campo da medicina humana, no entanto, alguns estudos já têm sido desenvolvidos no campo da experimentação animal. Na espécie caprina, Rodrigues (2001) caracterizou a adenosina desaminase (ADA) e suas isoenzimas e quantificou sua atividade no soro sanguíneo e líquido sinovial de caprinos com artrite encefalite caprina (CAE), observando que a atividade da ADA foi detectada no fígado, coração, duodeno, baço e pulmão, tendo como substrato a adenosina. E ainda, que no soro de animais com manifestação clínica de CAE, a atividade da ADA mostrou-se elevada e diferente estatisticamente em relação aos animais normais.

Uma vez que os órgãos do sistema reprodutor masculino são controlados pelo sistema nervoso autônomo, em que o ATP é liberado pelos nervos que controlam o sistema reprodutor no processo definido como co-transmissão purinérgica; nucleotídeos e seus co-produtos, como por exemplo, nucleosídeos, são envolvidos no controle do sistema reprodutor (ANDERSSON e WAGNER, 1995; BURNSTOCK, 2014; GORODESKI, 2015).

Nucleotídeos e nucleosídeos celulares são descritos na literatura como moduladores das funções do sistema genital masculino, no controle da fertilidade e conseqüentemente na reprodução, pois estes atuam nos receptores da superfície celular, denominados de receptores de purinas (BURNSTOCK, 1978; FREDHOLM et al. 1994, 1996).

Existem dois tipos de receptores de purina P2 e P1. Os receptores P1 ocorrem em vários subtipos, ao passo que os receptores P2 são denominados em A1, A_{2A}, A_{2B} e A3. Estes receptores são classificados em inibitórios (A1 e A3), que inibem a enzima Adenil ciclase que degrada ATP em adenosina 3'5 – monofosfato cíclico (AMPc) e os estimulantes (A_{2A} e A_{2B}), que facilitam e estimulam a Adenil ciclase (FREDHOLM et al, 2011).

Receptores de adenosina foram encontrados dentro dos túbulos seminíferos, sugerindo uma relação da adenosina com espermátócitos (MURPHY et al., 1983). Estes receptores também foram encontrados em túbulos seminíferos imaturos de 10 dias de idade presente em ratos, podendo a adenosina estar envolvida com a regulação do equilíbrio energético das células dos túbulos seminíferos (CLERMONT e PEREY, 1957).

A adenosina tem um importante papel na capacitação dos espermatozoides, haja vista que foram encontrados receptores A₂ estimulantes em espermatozoides (MONKS e FRASER, 1988; FRASER, 1990; FRASER e DUNCAN, 1993; FÉNICHEL et al., 1996) e, que agonistas destes receptores poderiam estimular a produção de AMP cíclico em

espermatozoides não capacitados de humanos, acelerar a capacitação sem induzir a reação de acrossoma ou mudanças de motilidade (BELLEZZA e MINELLI, 2017).

Receptores A1 de classe inibitória foram encontrados em espermatozoides de mamíferos sendo estes estão envolvidos com a mobilização de cálcio. Esta ação é essencial para a regulação das funções espermáticas (BELLEZZA e MINELLI, 2017). A estimulação da capacitação de espermatozoides de humanos foi observada, ao se utilizar um agonista altamente seletivo de receptores A1 de adenosina, o que seria comum em todas as espécies mamíferas (OSYCKA-SALUT et al., 2014).

A adenosina presente no trato reprodutivo da fêmea e, receptores de adenosina, mais especificamente receptores A1, podem representar um mecanismo regulatório, presente no espermatozoide e regular a resposta fisiológica do espermatozoide para prevenir reação espontânea de acrossoma (Figura 2) (BELLEZZA e MINELLI, 2017).

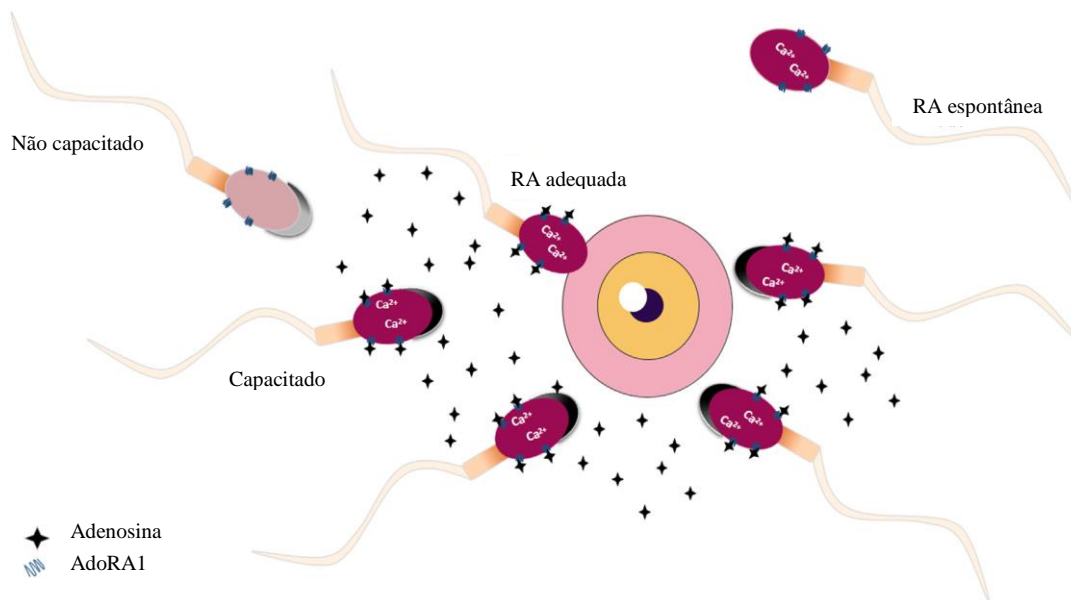


Figura 2 - Papel da Adenosina e seus receptores na capacidade fertilizante dos espermatozoides. Os espermatozoides são preparados para se tornar competentes em fertilização, como por exemplo, capacitados, no trato reprodutivo da fêmea, onde a adenosina está presente em altas concentrações micromolares. Espermatozoides capacitados sofrem reação de acrossoma, um processo excitatório pelo qual os espermatozoides se fundem com a membrana plasmática do óvulo, permitindo a transferência do material genético masculino para o óvulo. A reação de acrossoma deve ser estritamente controlada e ocorre na presença do óvulo. De fato, o espermatozoide perde sua capacidade fertilizante quando a reação de acrossoma ocorre no trato reprodutivo da fêmea, longe do óvulo. A adenosina e receptores A1 (AdoRA1) provavelmente representam um mecanismo pelo qual espermatozoides capacitados são impedidos de terem reação de acrossoma (RA) espontânea e perdem o acrossoma somente nas proximidades do óvulo (Adaptado de BELLEZZA e MINELLI, 2017).

Na espécie ovina, Borges et al. (2015) avaliaram a ação antioxidante do nucleosídeo purinérgico sobre as características físicas do sêmen *in natura*, verificando que a adição deste

aditivo é viável para a manutenção espermática principalmente nas concentrações 0,5 e 1,5 %, no entanto não contribuiu com a melhoria dos parâmetros físicos avaliados.

Corroborando com estes resultados Borges (2018), ao estudar a adição da adenosina sobre os parâmetros físicos do sêmen de ovinos após o resfriamento por 4 horas (tempo de equilíbrio) concluiu que o nucleosídeo não teve efeito no sêmen quanto à motilidade e vigor espermático. No entanto, Nascimento (2018), encontrou resultados benéficos quanto à motilidade, vigor e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, ao avaliar a qualidade do sêmen *in natura* diluído e pós-congelação com a adição da adenosina ao meio diluente.

A adenosina poderia atuar também como um potencial antioxidante, haja vista que muitos autores têm demonstrado que a adenosina é liberada em diferentes tecidos sob estresse oxidativo (REGO et al., 1997; MASINO et al. 1999; CHEN et al. 2001); e ainda, quando estes tecidos são tratados com adenosina e/ou com agonista de seus receptores ocorre uma melhora significativa da peroxidação lipídica (YAVUZ et al., 1997; MAGGIRWAR et al., 1994), além da recuperação do dano celular (ALMEIDA et al., 2003; MASINO et al., 1999). O importante papel regulatório deste nucleosídeo na inflamação e imunidade também tem sido descrito (GARCIA SORIANO et al., 2001; MABLEY et al., 2003; HASKO e CRONSTEIN, 2004).

Ao conseguir bloquear receptores A1 de adenosina pela liberação deste nucleosídeo no sistema nervoso de ratos com lesão induzida por espécies reativas de oxigênio em fatias de hipocampo, ALMEIDA et al., 2003 observaram que a liberação da adenosina promoveu a restauração neural.

REFERÊNCIAS

- AFFONSO, F.J.; CELEGHINI, E.C.C.; CARVALHO, H.F.; LANÇONI, R.; LEMES, K.M.; LEITE, T.G.; OLIVEIRA, L.Z.; DE ARRUDA, R.P. Addition of antioxidants myoinositol, ferulic acid and melatonin and their effects on sperm motility, membrane integrity and reactive oxygen species production in cooled equine semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 59, 57-63, 2017.
- AITKEN RJ, BAKER M. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction, Fertility, and Development**, v.16, p.581–8, 2004.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility, and Development**, v.7, p.659-668, 1995.
- AKÉ-VILLANUEVA, J. R.; AKÉ-LÓPEZ, J.R.; SEGURA-CORREA, J. C.; MAGAÑA-MONFORTE, J. G.; AKÉ-VILLANUEVA, N. Y. Factors affecting conception rate of hair ewes after laparoscopic insemination with chilled semen under tropical conditions. **Small Ruminant Research**, v. 153, p. 114–117, 2017.
- ALLAI, L.; DRUART, X.; CONTELL, J.; LOUANJLI, N.; BEN MOULA, A.; BADI, A.; ESSAMAD, A.; NASSER, B.; EL AMIRI, B. Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris orskim milk based extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 160, p. 57–67. 2015.
- ALMEIDA, C.G.; DE MENDONÇA, ALEXANDRE, CUNHA, R.A.; RIBEIRO, J. A. Adenosine promotes neuronal recovery from reactive oxygen species induced lesion in rat hippocampal slices. **Neuroscience Letters**, v. 339, p.127–130, 2003.
- 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, p. 145-174, 1987.
- ANDERSSON, K.E., WAGNER, G., Physiology of penile erection. **Physiological Reviews**, v. 75, p.191-236, 1995.
- BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on sêmen functions. **Veterinary Medicine International**, v.2011, p.1-7, 2010.
- BAUMBER, J., SABEUR, K., VO, A., BALL, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.60, p.1239-1247, 2003.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, p.895–902, 2000.
- BELLEZZA, I.; MINELLI, A. Adenosine in sperm physiology. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 55 p.102-109, 2017.

BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.120-126, 2003.

BITTENCOURT, R. F.; OBA, E. ; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALHOUB, Marcos; AZEVEDO, Hymerson Costa ; BICUDO, S. D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino i: diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira** (Online), v. 14, p. 522-536, 2013.

BITTENCOURT, R. F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A. L.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H. C.; BICUDO, S. D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: Diluidores e crioprotetores. **Ciência animal brasileira**, Goiânia, v.14, n.4, p. 522-536, 2013.

BORGES, N.P. **Avaliação do nucleosídeo purinérgico sobre as características físicas do sêmen resfriado de ovinos**. 2018. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Reprodução em pequenos ruminantes). Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2018.

BORGES, N.P.; RODRIGUES, J.N.D.; COSTA, A.K.T.; SILVA, G.P.; CASTILHO, E. F.; RODRIGUES, L.F.S. Avaliação do nucleotídeo purinérgico sobre as características físicas do sêmen ovino. In: XIII SEMINÁRIO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRA, 2015, Belém. **Anais...** Belém: UFRA, 2015. Disponível em: <<http://www.pibic.ufra.edu.br/index.php/anais/anais-2015>>.

BURNAUGH, L, SABEUR K, BALL B. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p.580-589, 2007.

BURNSTOCK, G. **A basis for distinguishing two types of purinergic receptor**. In: Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach. New York: Raven Press, p.107-118, 1978.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling in the reproductive system in health and disease. **Purinergic Signal**, v.10, p.157-187, 2014.

CAMPUZANO, M.M.; RODRÍGUEZA, M.Á.; CANUL, J.T.; URUEÑA, E.L.; DE PAZ, P.; ANEL, L.; PASTOR, F.M. ÁLVAREZA, M. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. **Animal Reproduction Science**, v.151, p.137–147, 2014.

CARVALHO, L.E.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; SALES, A.L.R.; GONCZAROWSKA, A.T.; OLIVEIRA, H.N.; RESENDE, M.C.; NEVES, M.G.; MADISON, R.J. Physical characteristics and fertility of fractionated donkey semen cooled at 5°C. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.1, p.29-38, 2017.

CHEN, Y. F.; LI, P. L.; ZOU, A. P. Oxidative stress enhances the production and actions of adenosine in the kidney. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.281, p.1808-1816, 2001.

CLERMONT, Y.; PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. **The American Journal of Anatomy**, v.100, p.241-267, 1957.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine**, v.111, n.11, p.918-31, 1989.

COSTA, V.G.G.; JUNIOR, A. S.V.; GHELLER, S.M.M.; TAVARES, G. C.; FERREIRA, C. E. R.; CORCINI, C.D. Efeito da adição de taurina sobre espermatozoides ovinos refrigerados a 5°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.3, n.41, p.683-687, 2017.

CUNHA, R. A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochemistry International**, v.38, n.2, p.107-125, 2001.

DA SILVA, C.M.B; MACÍAS-GARCÍA, B.; MIRÓ-MORÁN, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORILLO-RODRIGUEZ, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GALLARDO-BOLAÑOS, J.M.; STILWELL, G.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v.51, n.2, p.172–9, 2011.

DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology & Medicine**, v.14, p.255-265, 1993.

DONOVAN, A.; HANRAHAN, J. P.; KUMMEN, E.; DUFFY, P.; BOLAND, P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen–thawed semen at a natural or synchronised oestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 359-368, 2004.

DRUART, X.; COGNIÉ, J.; BARIL, G.; CLÉMENT, F.; DACHEUX, J.L.; GATTI, J.L. *In vivo* imaging of *in situ* motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract. **Reproduction**, v.138, p.45-53, 2009.

DU PLESSIS, S.S.; HAGENNAAR, K.; LAMPPIO, F. The *in vitro* effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. **Andrologia**, v.42, p.112–6, 2010.

ELTZSCHIG, H. K. Adenosine: an old drug newly discovered. **Anesthesiology**, v. 111, n. 4, p. 904-15, 2009.

FALCHI, L.; GALLERIB, G.; ZEDDAA, M.T.; PAUA, S.; BOGLIOLOA, L.; ARIUA, F.; LEDDA, S. Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. **Livestock Science**, v. 207, p.1–6, 2018.

FÉNICHEL, P., GHARIB, A., EMILIOZZI, C., DONZEAU, M., MÉNÉZO, Y. Stimulation of human sperm during capacitation *in vitro* by an adenosine agonist with specificity for A₂ receptors. **Biology of Reproduction**, v. 54, p.1405-1411, 1996.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-8, 1997.

FORNAZAR, R.; MATEUS, Ó.; CORREIA, T.; QUINTAS, H.; MAURÍCIO, R.; CONRADI, A.; FRANCISCO, L.; ÁLVARO, A.; VALENTIM, R. Estrus Synchronization

and Artificial Insemination with Fresh and Chilled Semen in Assaf Ewes. **Agricultural Sciences**, v.9, p.8-22, 2018.

FRASER, L.R. Adenosine and its analogues, possibly acting at A₂ receptors, stimulate mouse sperm fertilizing ability during early stages of capacitation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.89, p.467-476, 1990.

FRASER, L.R., DUNCAN, A.E. Adenosine analogues with specificity for A₂ receptors bind to mouse spermatozoa and stimulate adenylate cyclase activity in uncapacitated suspensions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 187-194, 1993.

FREDHOLM, B.B. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1-34, 2011.

FREDHOLM, B.B., ABBRACCHIO, M.P., BURNSTOCK, G., DALY, J.W., HARDEN, K.T., JACOBSON, K.A., LEFF, P., WILLIAMS, M. Nomenclature and classification of purinoceptors. **Pharmacological Reviews**, v. 46, p. 143-156, 1994.

FREDHOLM, B.B., BURNSTOCK, G., HARDEN, K.T., SPEDDING, M. Receptor nomenclature. **Drug Development Research**, v.39, p.461-466, 1996.

GARCIA SORIANO. L.; LIAUDET, L.; MARTON, A.; HASKÓ, G.; BATISTA, L. C.; DEITCH, E.A.; SZABÓ, C. Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 4, p. 703-8, 2001.

GHELLER, S.M.M.; CORCINIA, C. D.; PRADIEÉA, J.; RIZZOTOA, G.; JUNIORA, T.L.; MOREIRAA, F.; JUNIORA, A.S. V. Gelatin protects ram semen stored for 72 h at 5 °C. **Small Ruminant Research**, v.158, p.54–56, 2018.

GORODESKI, G.I. Purinergic signalling in the reproductive system. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.191, p.82-101, 2015.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoal. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12. p.131-147, 1996.

GRIVEAU JF, DUMONT E, RENARD P, CALLEGARI JP, LE LANNOU D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**,v.103, p.17–26, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press, 936p. 1999.

HASKO, G.; CRONSTEIN, B. N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 33-9, 2004.

JÓZWIK M, JÓZWIK M, KUCZYNSKI W, SZAMATOWICZ M. NONENZYMATIC. antioxidant activity of human seminal plasma. **Fertil Steril**, v.68, p.154-157, 1997.

KING, M.E.; MCKELVEY, W.A.C.; DINGWALL, W.S.; MATTHEWS, K.P.; GEBBIE, F.E.; MYLNE, M.J.A.; STEWART, E.; ROBINSON, J.J. Lambing rates and litter sizes following intrauterine or cervical insemination of frozen/thawed semen with or without oxytocin administration. **Theriogenology**, v. 62, p.1236–1244, 2004.

MABLEY, J. G.; PACHER, P.; LIAUDET, L.; SORIANO, F.G.; HASKÓ, G.; MARTON, A.; SZABO, C.; SALZMAN, A.L. Inosine reduces inflammation and improves survival in a murine model of colitis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 284, n. 1, p. G138-44, 2003.

MAGGIRWAR, S. B.; DHANRAJ, D. N.; SOMANI, S. M.; RAMKUMAR, V. Adenosine acts as an Endogenous activator of the cellular antioxidant defense system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.201, n.2, p. 508-515, 1994.

MAIA, M.S. Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial em Caprinos e Ovinos. **Governo do Estado do Rio Grande do Norte**,13. 2010.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193, 2009.

MARQUES A, ARRUDA RP DE, CELEGHINI ECC, GOBESSO AAO, NETO JRN. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v.58, p.257–60, 2002.

MASINO, S. A.; MESCHES, M. H.; BICKFORD, P. C.; DUNWIDDIE, T. V. Acute peroxide treatment of rats hippocampal slices induces adenosine-mediated inhibition of excitatory transmission in área CA1. **Neuroscience Letters**, v. 274, p.91-94, 1999.

MAXWELL, W.M.C; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.55-65, 1996.

MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; NEVES, J.P. Viabilidade do sêmen ovino refrigerado em diferentes diluentes. **Archives of Veterinary Science** v.5, p.29-33, 2000.

MISHRA, D.P.; SHAHA, C. Estrogen-induced spermatogenic cell apoptosis occurs via the mitochondrial pathway: role of superoxide and nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.6181-6196, 2005.

MONKS, N.J., FRASER, L.R. Inhibition of adenosine-metabolizing enzymes modulates mouse sperm fertilizing ability: a changing role for endogenously generated adenosine during capacitation. **Gamete Research**, v.21, p.267-271, 1988.

MUIÑO-BLANCO, T., PÉREZ-PÉ, R., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p.18–31, 2008.

MURPHY, E.M.; EIVERS, B.; O'MEARA, C.M.; LONERGAN, P.; S. FAIR. Effect of storage temperature, nitrogen gassing and sperm concentration on the in vitro semen quality and in vivo fertility of liquid bull semen stored in INRA96. **Theriogenology**, v.108, p.223-228, 2018.

MURPHY, K.M., GOODMAN, R.R., SNYDER, S.H. Adenosine receptor localization in rat testes: biochemical and autoradiographic evidence for association with spermatocytes. **Endocrinology**, v.113, p.1299-1305, 1983.

NASCIMENTO, T. E.C. **Uso da adenosina como aditivo de sêmen ovino *in natura* e criopreservado**. 2018. 53f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém, 2018.

NORDBERG J ARNÉR ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.

O'FLAHERTY C, BEORLEGUI N, BECONI MT. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **International Journal of Andrology**, v.26, p.109-114, 2003.

O'HARA, L.; HANRAHAN, J.P.; RICHARDSON, L.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; EVANS, A.C.O.; LONERGAN, P. Effect of storage duration, storage temperature, and diluente on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, v.73, p.541–549, 2010.

OSYCKA-SALUT, C., DIEZ, F., BURDET, J., GERVASI, M.G., FRANCHI, A., BIANCIOTTI, L.G., DAVIO, C., PEREZ-MARTINEZ, S. Cyclic AMP efflux, via MRPs and A1 adenosine receptors, is critical for bovine sperm capacitation. **Molecular Human Reproduction**, v.20, p.89-99, 2014.

OVERVELD, F.W.P.C.; HAENEN, G.R.M.M.; RHEMREV, J.; VERMEIDEN, J.P.W.; BAST, A. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. **Chemico-Biological Interactions**, v.127, p.151-161, 2000.

PARKS, J.E. **Hypothermia and Mammalian gametes**, In: KAROW, A.M.; CRITSER, J.K. (Eds.) *Reproduction Tissue Banking: scientific principles*. San Diego: Academic Press, 1997. p. 229-261.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.

PEIXOTO, R.M.; ANDRIOLI, A.; SANTOS, D.O.; PINHEIRO, R. R.; ARAÚJO, J. F.; SOUSA, A.L.M.; SILVA, D.F.; DAMASCENO, E. M.; TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação da toxicidade de solvente de extratos vegetais com ação antiviral em sêmen caprino refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, .45, p.1487. 2017.

PEÑA, F. J.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA., J.A.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZALEZ FERNANDEZ, L.; MACIAS GARCIA, B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.345-349, 2009.

POLOSA, R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosinemediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **European Respiratory Journal**, v. 20, n. 2, p. 488-96, 2002.

POLOSA, R.; HOLGATE, S. T. Adenosine receptors as promising therapeutic targets for drug development in chronic airway inflammation. **Current Drug Targets**, v. 7, n. 6, p. 699-706, 2006.

RAO, M. V.; GANGADHARAN, B. Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in ouspermatozoa in vitro. **Toxicology in Vitro**, v.22, p.935-42, 2008.

REGO, A. C.; SANTOS, M. S.; OLIVEIRA, C. R. Adenosine Triphosphate degradation products after oxidative stress and metabolic dysfunction in cultured retinal cells. **Journal of Neurochemistry**, v.69, n.3, p.1228-1235, 1997.

RODRIGUES, L. F. S.. **Caracterização da Adenosina desaminase (ADA) e suas isoenzimas em tecidos caprinos: Um modelo para o estudo da Artrite Encefalite Caprina (CAE)**. 2001. 133 p. Tese (Doutorado em farmacologia) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2001.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38. p. 1-36, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SANTOS, G.C.J. **Congelabilidade do sêmen eqüino em diferentes diluidores**. 2003. 50f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2003.

SILVA-MEIRELLES, J.R.; CASTRO, M.L.; BERGSTEIN, T.G.; FERRARI, M.V.; DORNBUSCH, P.T. Inseminação em ovelhas por videolaparoscopia por meio de acesso único: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.5, p.1163-1166, 2017.

SIQUEIRA, A. P. **Inseminação artificial em caprinos com sêmen resfriado**. 2006. 106 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.

SUCCU S, BERLINGUER F, PASCIU V, SATTI V, LEONI GG, NAITANA S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. **Journal of Pineal Research**, v.50, p.310-8, 2011.

TRENTIN, J. M.; RODRIGUES, M. F.; PESSOA, G. A.; FIORENZA, M.F.; SCHENATTO, R.O.; ARAUJO, L.B.; AIRES, K.V. RUBIN, M. I. B. Viability of Pony Stallion Semen in Different Temperature and Dilution. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2017. 45: 1482.

VAKANJAC, S.; MAGAŠ, V.; BABIĆ, V.; MALETIĆ M.; ĐURIĆ S.; APIĆ J.; MIRILOVIĆ M. Analysis of reproductive parameters after intrauterine insemination of sows with semen stored for different time periods. **Veterinarski Glasnik**, v.71, n.2, p.98-106, 2017.

VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M. Membrana plasmática do espermatozóide. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 36, p. 45-53, 2001.

VISHWANATH, R., SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. **Reproduction, Fertility, and Development**, v.9, p.321-331, 1997.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, fertility, and development**, v.5, p.639-658, 1993.

YAVUZ, O.; TÜRKÖZKAN, N.; BILGIHAN, A.; DOUGULU, F.; AYKOL, S. The effect of 2-chloroadenosine on lipid peroxide level during experimental cerebral ischemia-reperfusion in Gerbils. **Free Radicals Biology and Medicine**. v. 22, n.1/2, p.337-347, 1997.

ZALATA, A. A.; DEPUYDT, C. E. White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 154-162, 1998.

ZINI, A. DE FREITAS, G. FREEMAN, M., HECHTER, S.; JARVI, K. Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.75, p.461-464, 2000.

26 1,5 % de adenosina. As amostras foram retiradas do
27 resfriamento após 4, 8, 12 e 16 horas e avaliadas pela
28 motilidade espermática retilínea progressiva, vigor espermático
29 e realização do teste supravital. Os dados obtidos foram
30 submetidos à análise de variância com posterior diferença de
31 médias pelo teste de Tukey e posterior análise de regressão, a
32 nível de 5 % de probabilidade. Verificou-se o efeito da
33 interação dos fatores para a variável motilidade progressiva
34 retilínea. Após 8 horas de resfriamento todos os níveis de
35 adenosina mostraram-se médias superiores ($P \leq 0,05$) da
36 motilidade em relação ao controle, estando somente o nível de
37 0,75 % do nucleosídeo, dentro deste tempo de resfriamento, de
38 acordo com padrões preconizados pelo CBRA. Verificou-se
39 efeito quadrático da motilidade retilínea progressiva em função
40 dos níveis de adenosina para cada tempo de resfriamento
41 estudado, com as máximas concentrações recomendadas de
42 0,81 e 1,04 % de adenosina com 4 e 8 horas, respectivamente.
43 A adenosina também promoveu efeito protetivo até 16 horas de
44 resfriamento sobre a integridade estrutural da membrana
45 plasmática com a adição das concentrações 0,5 e 0,75 %.

46 Keywords: Reprodução animal. Estresse oxidativo.
47 Nucleosídeo purinérgico.

48 **Introdução**

49 A inseminação artificial com sêmen resfriado apresenta
50 vantagens quanto ao seu uso nos programas reprodutivos, pois

51 o processo de resfriamento permite que os espermatozoides
52 mantenham-se viáveis por mais tempo em relação ao sêmen
53 fresco em virtude da redução metabólica (Allai et al., 2015;
54 Falchi et al. 2018).

55 Entretanto, o metabolismo normal das células
56 espermáticas promove a liberação de metabólitos denominados
57 de espécies reativas ao oxigênio (Reactive Oxygen Species –
58 ROS), processo conhecido como estresse oxidativo (Maxwell e
59 Watson, 1996), que é agravado pelo processo de resfriamento,
60 lesionando a membrana plasmática dos espermatozoides
61 (Zalata e Depuydt, 1998).

62 Portanto, no intuito de combater o estresse oxidativo
63 provocado pelo resfriamento do sêmen, alguns estudos têm sido
64 realizados em diferentes espécies animais testando substâncias
65 com potencial antioxidante (Campuzano et al., 2014; Affonso
66 et al., 2017), almejando a manutenção da qualidade espermática
67 em um meio diluente por mais tempo.

68 A adenosina é um nucleosídeo purinérgico formado por
69 uma ligação glicosídica entre uma base púrica adenina e uma
70 D-ribose (Polosa, 2002; Polosa e Holgate, 2006). Nucleotídeos
71 e nucleosídeos são participantes das funções do sistema genital
72 masculino, e este sistema possui receptores de purinas na
73 superfície celular. Estas funções estariam relacionadas com o
74 controle da fertilidade e reprodução (Burnstock, 1978;

75 Fredholm et al., 1996; Rodrigues, 2000; Bellezza e Minelli,
76 2017).

77 Estudos envolvendo a adição da adenosina como um
78 aditivo em meio diluente para o sêmen animal são escassos,
79 portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial deste
80 nucleosídeo em diferentes concentrações sobre a viabilidade do
81 sêmen resfriado de ovinos.

82 **Material e Métodos**

83 *Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)*

84 Todos os procedimentos seguiram as normas do
85 CONCEA e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de
86 Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural da Amazônia
87 – UFRA, Brasil – Protocolo nº037/2017 (CEUA) e
88 23084.011913/2017-21 (UFRA).

89 *Local do experimento*

90 O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisas
91 em Caprinos e Ovinos do Pará (CPCOP), localizado na
92 Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA/Campus
93 Belém), mesorregião do estado do Pará, cujas coordenadas
94 geográficas correspondem a 1°27'15" Sul e 48°26'50" Oeste,
95 com uma altitude de 14 m. Este estudo foi realizado no período
96 de dezembro de 2017 a março de 2018.

97 O clima da região é caracterizado como *Af* (Tropical
98 úmido) de acordo com a classificação climática de Köppen-
99 Geiger, com temperatura média anual de 25,9 °C e máxima e

100 mínima de 31,4 e 21,9 °C, respectivamente. Além disso, o
101 clima local é caracterizado pela alta precipitação pluviométrica,
102 onde a média anual é de aproximadamente 3.000 mm,
103 concentrando-se de dezembro a maio. A região apresenta uma
104 umidade relativa do ar média anual de 84 % e radiação solar
105 média anual de 2.338,3 horas.

106 *Delineamento experimental*

107 O delineamento experimental utilizado foi em blocos
108 com esquema fatorial 5 x 4, sendo cinco níveis de adenosina e
109 quatro tempos de resfriamento com efeito do animal e da
110 coleta. Foram utilizados seis carneiros adultos, da raça Santa
111 Inês, hígdidos e apresentando bom escore de condição corporal.

112 Os reprodutores foram criados em sistema semi-
113 intensivo, soltos no início da manhã para pastejo em capim
114 *Brachiaria humidicola* e presos no final da tarde, quando
115 recebiam volumoso (*Pennisetum purpureum*) triturado e ração.
116 O fornecimento de água e suplemento mineral foram *ad*
117 *libitum*.

118 Antes do início do experimento, os animais foram
119 submetidos ao exame andrológico por meio da vagina artificial
120 (42 a 44 °C) e tiveram suas reservas extragonádicas esgotadas.
121 Somente os animais aptos à reprodução fizeram parte do grupo
122 experimental, em que os parâmetros reprodutivos foram
123 baseados nos valores preconizados pelo Colégio Brasileiro de
124 Reprodução Animal – CBRA (2013).

125 As coletas de sêmen foram realizadas a cada três dias,
126 obtendo-se um total de seis ejaculados viáveis de cada
127 reprodutor, totalizando 36 repetições.

128 Antes das coletas de sêmen, realizou-se a
129 higienização/antisepsia do prepúcio de cada animal com
130 solução de Kilol® a 1 %. As coletas foram feitas com auxílio
131 de fêmeas manequins estrogenizadas com 1 mg de cipionato de
132 estradiol (E.C.P – Zoetis ®) e contidas apropriadamente para a
133 espécie ovina. Após a coleta do sêmen, as amostras foram
134 acondicionadas em banho maria a 37 °C para análise e
135 processamento.

136 *Análise física do sêmen e morfológica dos espermatozoides*

137 Na avaliação física do sêmen fresco, foram analisados
138 os seguintes aspectos: volume (ml), aspecto (aquoso,
139 opalescente, leitoso e cremoso), turbilhonamento (0-5),
140 motilidade espermática progressiva retilínea (%), vigor (0-5) e
141 concentração espermática (sptz/ml). Uma gota de sêmen de
142 cada ejaculado foi colocada em uma lâmina previamente
143 aquecida a 37 °C. Em aumento microscópio de 100 X, foi
144 avaliado o turbilhonamento (movimento espermático em
145 massa). Posteriormente, colocou-se uma lamínula previamente
146 aquecida a 37 °C sobre a gota de sêmen, e em aumento de 400
147 X, foram avaliados a motilidade espermática progressiva
148 retilínea e o vigor espermático de acordo com o CBRA (2013).
149 A concentração espermática (Sptz/ml) foi calculada pela

150 espectrofotometria (Spectrum Lab 22 PC[®]), adicionando-se 20
151 µl de sêmen *in natura* em 8 ml de solução de concentração
152 ovina em um tubo de ensaio.

153 Em tubo plástico de 1,5 ml contendo 1 ml de formol-
154 salino tamponado (Hancock, 1957), foram acondicionados
155 alíquotas do sêmen suficiente para turvar a solução, para
156 análise morfológica dos espermatozoides por meio de
157 preparação úmida e com auxílio de microscopia em aumento de
158 1000 X. Foram contabilizadas 200 células por ejaculado e
159 mensurados em percentagem os defeitos espermáticos segundo
160 Blomm (1973) e preconizados pelo CBRA (2013).

161 Para avaliação da integridade estrutural da membrana
162 plasmática da cabeça dos espermatozoides, foi realizado o teste
163 supravital, classificando-os em vivos (% não corados) e mortos
164 (% corados de rosa ou vermelho) (Smith e Murry, 1997). Para
165 isso, uma alíquota de 10 µL do sêmen foi homogeneizada na
166 proporção de 1:1 com solução de eosina-nigrosina em lâmina
167 previamente aquecida a 37 °C. Posteriormente, foi feito o
168 esfregaço e avaliado a percentagem de espermatozoides vivos
169 (não-corados), após 60 segundos de confecção da lâmina
170 (Mayer et al., 1951; Swanson e Bearden, 1951).

171 Foram considerados ejaculados ideais para este estudo,
172 aqueles que apresentarem padrões físicos mínimos de volume
173 total de 0,5 ml, vigor espermático 3 e motilidade espermática
174 mínima de 80 % .

175 *Diluição, resfriamento e avaliação do sêmen*

176 A partir do cálculo da concentração do sêmen *in natura*,
177 as diluições de cada tratamento foram realizadas para manter
178 uma concentração de 50 milhões de espermatozoides por
179 palheta de 0,25 mL. Procedeu-se a diluição do sêmen com o
180 extensor comercial Andromed (Minitube®) (controle),
181 Andromed + 0,5 % de Adenosina (Sigma®), Andromed + 0,75
182 % de Adenosina, Andromed + 1 % de Adenosina, Andromed +
183 1,5 % de Adenosina.

184 Antes do resfriamento, as amostras foram devidamente
185 identificadas e colocadas na máquina de congelamento de
186 sêmen (3000 – TK®) até a etapa do resfriamento, realizado
187 com o Protocolo Ovino, de acordo com as recomendações do
188 fabricante para sêmen de ovinos.

189 Após 4, 8, 12 e 16 horas de resfriamento, as amostras
190 acondicionadas em banho maria a 37 °C e avaliadas quanto a
191 motilidade espermática progressiva retilínea, vigor espermático
192 e integridade estrutural da membrana plasmática dos
193 espermatozoides obtida pelo teste supravital.

194 *Análises estatísticas*

195 Os dados obtidos foram submetidos ao teste de
196 D'Agostino para análise de normalidade. Todas as variáveis
197 dependentes tiveram distribuição normal sendo submetidas à
198 análise de variância com posterior diferença de médias pelo
199 teste de Tukey e posterior análise de regressão. A seguir,

200 realizou-se a correlação de Pearson para verificar relação das
201 variáveis de caráter subjetivo (análise de motilidade e vigor
202 espermático) com o teste complementar de supravital, segundo
203 parâmetros estabelecidos por Santos (2007).

204 O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$205 Y_{ijkl} = \mu + \text{Bloc1}_k + \text{Bloc2}_m + \text{AD}_i + \text{TR}_j + (\text{AD}*\text{TR})_{ij} + e_{ijkl}$$

206 Y = valor para a variável em estudo;

207 μ = efeito da média geral;

208 Bloc1_k = primeiro bloco, efeito da coleta;

209 Bloc2_m = segundo bloco, efeito do animal;

210 AD_i = primeiro fator, efeito dos níveis de adenosina;

211 TR_j = Segundo fator, efeito dos tempos de resfriamento;

212 $(\text{AD}*\text{TR})_{ij}$ = efeito da interação do do i -ésimo nível do
213 primeiro fator com o j -ésimo nível segundo fator;

214 e_{ijkl} = erro associado a cada observação.

215 Todas as análises foram realizadas a nível de 5 % de
216 probabilidade com o auxílio do programa estatístico R Core
217 Team (versão 3.5.0) e, os gráficos criados com a ferramenta de
218 análise VBA do Excel.

219 **Resultados**

220 Para o sêmen *in natura*, todos os parâmetros físicos
221 estavam de acordo com os valores preconizados pelo CBRA
222 (2013) para ejaculados de ovinos coletados por meio da vagina
223 artificial (Tabela 1).

224 **Tabela 1** – Valores médios e desvios-padrão dos parâmetros físicos do
 225 sêmen e morfológicos dos espermatozoides *in natura* de ovinos Santa Inês.

Parâmetros	Valores
Volume (ml)	1,01 ± 0,17
Aspecto*	3,44 ± 0,44
Turbilhamento (0-5)	3,97 ± 0,40
Motilidade espermática progressiva retilínea (%)	82,78 ± 3,07
Vigor espermático (0-5)	4,08 ± 0,40
Teste supravital (%)	85,06 ± 6,27
Concentração espermática ($\times 10^9$ sptz/ml)	3,85 ± 0,58
Defeitos espermáticos maiores (%)	9,94 ± 14,43
Defeitos espermáticos menores (%)	15,82 ± 12,15
Defeitos espermáticos totais (%)	25,76 ± 18,65
Espermatozoides normais (%)	74,24 ± 18,65

226 *(1-aquoso, 2- opalescente, 3- leitoso, 4- cremoso).

227 Na Tabela 2 estão representados os valores médios de
 228 motilidade progressiva retilínea, verificando-se efeito da
 229 interação dos fatores níveis de adenosina e tempos de
 230 resfriamento. Após o resfriamento por 4 horas, as
 231 concentrações de 0,5 e 0,75 e 1% de adenosina apresentaram
 232 valores superiores ($P \leq 0,05$) de motilidade espermática em
 233 relação aos demais tratamentos. Ao final de 8 horas de
 234 resfriamento, todos os tratamentos contendo a adenosina
 235 mostraram-se superiores ($P \leq 0,05$) ao controle. Com 12 e 16
 236 horas de incubação a 5 °C, valores superiores ($P \leq 0,05$) da
 237 motilidade espermática foram observados nos tratamentos que
 238 receberam a adição de 0,5 e 0,75 de adenosina.

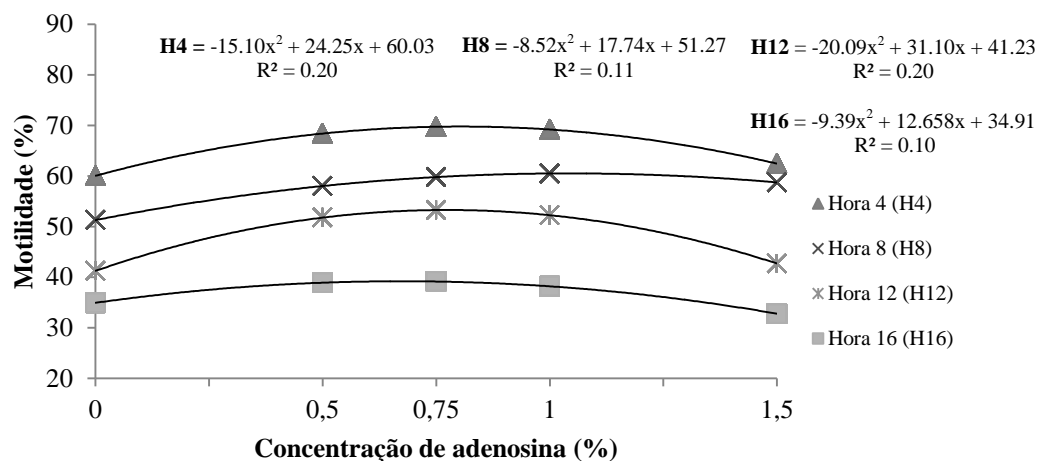
239 Comparando os diferentes períodos de resfriamento, no
 240 tratamento controle, houve um decréscimo significativo da
 241 motilidade espermática de 4 a 12 horas. Porém, não houve
 242 diferença ($P>0,05$) da motilidade espermática entre os tempos
 243 de 12 e 16 horas de resfriamento. Nos tratamentos com
 244 concentração de 0,5 e 1 % de adenosina, houve um decréscimo
 245 ($P\leq 0,05$) dos valores médios de motilidade espermática à
 246 medida que se aumentava o período de incubação a 5 °C. No
 247 tratamento contendo 0,75 % do nucleosídeo, observaram-se
 248 valores superiores ($P\leq 0,05$) com 4 horas de resfriamento,
 249 porém, não houve diferença significativa entre as incubações de
 250 8 e 12 horas. Ao ser adicionado 1,5 % de adenosina,
 251 registraram-se médias superiores ($P\leq 0,05$), tanto com 4 como
 252 com 8 horas de resfriamento (Tabela 2).

253 **Tabela 2** – Valores médios e desvios-padrão da motilidade espermática
 254 progressiva retilínea do sêmen resfriado de ovinos de acordo com a
 255 concentração de adenosina e tempo de resfriamento a 5 °C.

Tempo de resfriamento (° C)	Nível de adenosina				
	0%	0,5%	0,75%	1%	1,5%
4 horas	59,6 ± 9,08 ^{cA}	69,3 ± 8,54 ^{abA}	71,0 ± 7,87 ^{aA}	66,8 ± 8,03 ^{abA}	63,1 ± 8,96 ^{bcA}
8 horas	50,9 ± 8,18 ^{bbB}	58,8 ± 12,60 ^{abB}	61,2 ± 13,48 ^{abB}	58,2 ± 12,70 ^{abB}	59,3 ± 11,39 ^{aA}
12 horas	40,9 ± 12,40 ^{dcC}	51,6 ± 12,56 ^{abC}	56,6 ± 9,76 ^{abB}	48,7 ± 11,96 ^{bcC}	43,4 ± 15,99 ^{cdB}
16 horas	34,6 ± 13,83 ^{bcC}	38,3 ± 9,85 ^{abD}	43,4 ± 10,03 ^{aC}	34,0 ± 12,30 ^{bdD}	33,5 ± 13,55 ^{bcC}

256 Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha entre si ($P\leq 0,05$) pelo teste de
 257 Tukey.
 258 Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna, entre si ($P\leq 0,05$) pelo teste
 259 de Tukey.

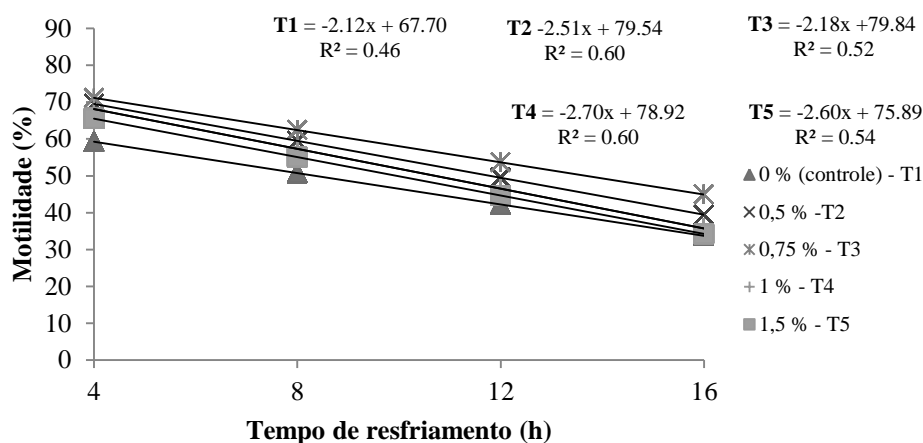
260 A motilidade espermática progressiva retilínea em
 261 função da concentração de adenosina demonstrou efeito
 262 quadrático ($P \leq 0,05$) nos quatro tempos de resfriamento
 263 estudados, com ponto máximo referente à adição de adenosina
 264 de 0,81, 1,04, 0,77 e 0,67 % para os tempos de resfriamento de
 265 4, 8, 12 e 16 horas, respectivamente (Figura 3).



266
 267

Figura 3 – Motilidade progressiva retilínea em cada tempo de resfriamento em função das concentrações de adenosina.

268 Em todos os tratamentos, observou-se um efeito linear
 269 negativo ($P \leq 0,05$) da motilidade espermática progressiva
 270 retilínea em função dos tempos de resfriamento. As
 271 concentrações 0,5 e 0,75 % de adenosina apresentaram uma
 272 menor declinação em relação aos demais (Figura 4).



273

Figura 4 – Motilidade progressiva retilínea de cada nível de adenosina em função do tempo de resfriamento.

274 Não foi verificada interação significativa entre os
 275 fatores de adição de adenosina e tempo de resfriamento para o
 276 vigor espermático e teste supravital. Diante disto, estudou-se o
 277 efeito de cada fator separadamente.

278 Para o vigor espermático e teste supravital, registraram-
 279 se valores superiores ($P \leq 0,05$) nos tratamentos contendo 0,5 %
 280 ($2,7 \pm 0,67$; $55,2 \pm 15,12$, respectivamente) e 0,75 % ($2,8 \pm 0,62$;
 281 $58,2 \pm 14,18$, respectivamente) de adenosina em relação aos
 282 demais e iguais entre si ($P > 0,05$) (Tabela 3).

Parâmetro	Concentração de adenosina				
	0%	0,5 %	0,75 %	1%	1,5 %
Vigor espermático	$2,42 \pm 2,42b$	$2,72 \pm 2,72a$	$2,81 \pm 2,81a$	$2,49 \pm 2,49b$	$2,36 \pm 2,36b$
Teste Supravital	$47,47 \pm 14,13c$	$55,17 \pm 15,12a$	$58,15 \pm 14,17a$	$50,96 \pm 14,69b$	$51,17 \pm 15,18a$

283

284 O vigor espermático e teste supravital diminuiram
 285 ($P \leq 0,05$) a cada tempo de resfriamento estudado. Os valores

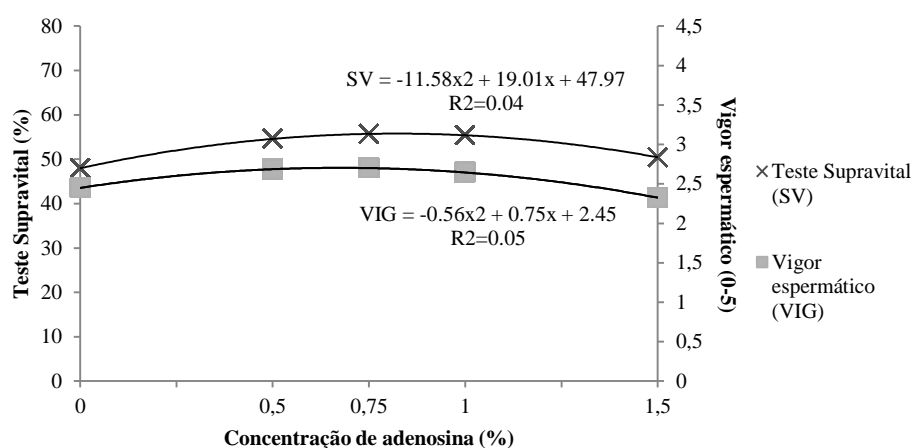
286 encontrados para o primeiro e segundo parâmetro estão
287 representados na Tabela 4.

288 Tabela 4 – Valores médios e desvios-padrão do vigor
289 espermático e teste supravital do sêmen resfriado de ovinos de
290 acordo com o tempo de resfriamento a 5 °C.

Parâmetro	Tempo de resfriamento (h)			
	4	8	12	16
Vigor espermático	3,19 ± 0,45a	2,82 ± 0,42b	2,36 ± 0,54c	1,86 ± 0,52d
Teste Supravital	66,36 ± 9,59a	58,46 ± 9,58b	48,01 ± 12,76c	35,97 ± 11,06d

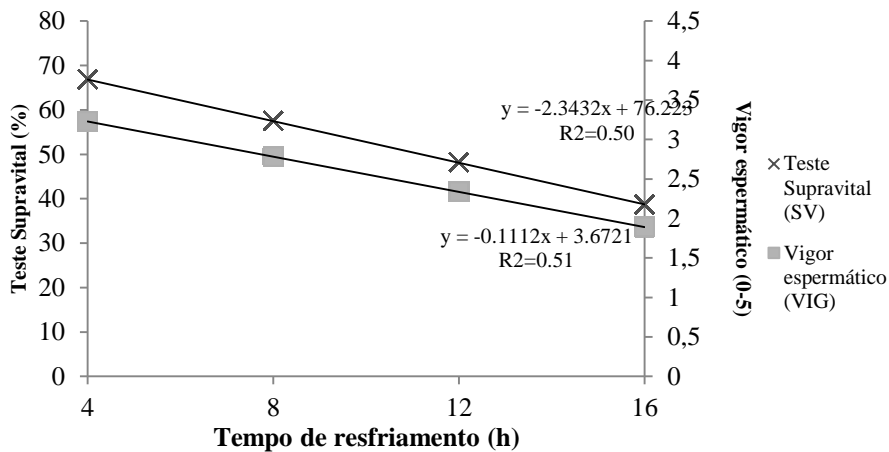
291

292 O teste supravital e o vigor espermático apresentaram
293 efeito quadrático, demonstrando nível ótimo de adenosina de
294 0,82 e 0,67, respectivamente (Figura 5). Por outro lado, estas
295 variáveis mostraram efeito linear negativo ao decorrer dos
296 tempos de resfriamento (Figura 6).



297

Figura 5 – Teste supravital e vigor espermático em função das concentrações de adenosina.



298

299 **Figura 6** - Teste supravital e vigor espermático em função do tempo de
300 resfriamento.

301 A análise de correlação mostrou que houve relação
302 positiva, significativa e alta da motilidade retilínea progressiva
303 com o vigor espermático ($r=0,87$) e com o teste supravital
304 ($r=0,86$), bem como do vigor com o teste supravital ($r=0,76$).

305 **Discussão**

306 Para o sêmen *in natura*, os valores médios dos
307 parâmetros estudados foram similares aos observados por
308 Frazão Sobrinho et al. (2014) e Maia et al. (2011) para ovinos
309 da raça Santa Inês.

310 O CBRA (2013) recomenda que o sêmen resfriado
311 tenha motilidade espermática igual ou maior que 60 % e vigor
312 igual ou maior que 3. Assim, os resultados encontrados com o
313 sêmen resfriado até oito horas e 0,75 % do nucleosídeo
314 purinérgico encontra-se dentro dos padrões recomendados pelo
315 colégio, quanto a motilidade espermática retilínea progressiva.

316 A correlação alta positiva e significativa identificada
317 entre as variáveis avaliadas de forma subjetiva (motilidade

318 progressiva retilínea e vigor espermático) com o teste
319 complementar supravital mostraram relação dos dados obtidos
320 no presente estudo.

321 A proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
322 (AMPK) está localizada em toda região acrossômica, na zona
323 equatorial e no flagelo do espermatozoide (Zhendong Zhu et
324 al., 2018), e a sua presença promove a refosforilação da
325 adenosina, formando adenosina monofosfato (AMP)
326 (Rodrigues et al., 2000). Em virtude disto, a adenosina
327 adicionada ao meio diluidor nas concentrações de 0,5 a 1 %,
328 pode ter favorecido a formação de AMP, com consequente
329 produção de energia, observado pelo aumento da motilidade e
330 vigor espermático nos diferentes tempos de resfriamento
331 estudados. O aumento dos valores destas variáveis devem
332 proporcionar um incremento na taxa de fertilização, visto que a
333 capacitação e a hiperativação espermática dependem
334 intimamente da produção de adenosina trifosfato (ATP) pela
335 peça intermediária do espermatozoide. Zhendong Zhu et al.
336 (2018), estudando a utilização de adenosina (análogo do AMP)
337 em meios diluidores de sêmen caprino, observaram um
338 aumento na produção de ATP e motilidade dos
339 espermatozoides, bem como uma melhoria na integridade da
340 membrana e na reação acrossômica. Da mesma forma, Vadnais
341 et al. (2014) constataram que o AMP produzido pela adenosina

342 quinase tem efeitos sobre a motilidade espermática de
343 camundongos.

344 O efeito benéfico da adenosina na manutenção da
345 qualidade do sêmen resfriado dos ovinos pode estar também
346 relacionado com a presença de receptores A_2 de adenosina no
347 espermatozoide, evidenciados por Monks e Fraser (1988),
348 Fraser (1990), Fraser e Duncan, (1993) e Fénichel et al. (1996).

349 Agonistas de receptores A_2 deste nucleosídeo poderiam
350 estimular a produção de AMP cíclico em espermatozoides não
351 capacitados de humanos (Liguori et al., 2005) e ratos (Fraser e
352 Duncan., 1993). Este AMP cíclico espermático estaria
353 profundamente envolvido no controle das funções espermáticas
354 (Hoskins et al., 1975; Garbers e KOPF., 1980; Tash e Means.,
355 1988), como no controle da motilidade e na obtenção da
356 capacidade fertilizante (Harrison, 2003). Shen et al., (1993)
357 observaram aumento da motilidade espermática em humanos
358 após a administração de um agonista específico de receptores
359 A_2 . Deste modo, é possível que a adição do nucleosídeo
360 purinérgico funcione como um agonista A_2 que contribui para a
361 formação de ATP e aumentando a motilidade e vigor
362 espermático até 16 horas de resfriamento em comparação com
363 o tratamento controle. Da mesma forma, a presença da
364 adenosina, principalmente na concentração de 0,5 e 0,75 %,
365 prolongou a viabilidade dos espermatozoides submetidos ao
366 resfriamento de até 16 horas. Por outro lado, quando a

367 adenosina foi adicionada em uma proporção maior (1,5 %), nos
368 tempos 4, 12 e 16 horas de resfriamento, pode ter ocorrido um
369 efeito refratário ao metabolismo destas células espermiática.

370 A interação dos fatores estudados (nível de adenosina x
371 tempo de resfriamento), para a característica motilidade
372 espermiática retilínea progressiva, revelou que existe uma
373 concentração adequada de adenosina para a obtenção de uma
374 melhor motilidade em cada tempo de resfriamento (4, 8, 12 e
375 16 horas), demonstrado pelo efeito quadrático encontrado da
376 motilidade em função das concentrações do nucleosídeo
377 (Figura 3).

378 Observou-se um efeito protetivo da adenosina sobre a
379 integridade estrutural da membrana plasmática dos
380 espermatozoides, evidenciado pelo teste supravital. Este achado
381 corrobora com Masino et al. (1999) e Almeida et al. (2003). De
382 acordo com Almeida et al. (2003), a adenosina também
383 promove recuperação neural de lesões induzidas por espécies
384 reativas de oxigênio (ROS). Sendo assim, a adição deste
385 nucleosídeo purinérgico pode ter funcionado como um
386 potencial antioxidante, melhorando a qualidade espermiática.

387 Alguns autores (Aitken, 1995; Ball et al, 2001) afirmam
388 que espermatozoides morfológica ou funcionalmente anormais
389 são os principais geradores de ROS, em relação aos normais.
390 Apesar dos valores registrados neste estudo (25,76 % de
391 espermatozoides anormais) estarem próximos aos limites

392 máximos preconizados pelo CBRA (2013), sugere-se que esta
393 proporção pode ter contribuído para o aumento da produção
394 dos ROS. Desta forma, o tratamento controle (sem adenosina)
395 apresentou menor viabilidade ao longo dos tempos de
396 resfriamento, pela possível ausência da ação antioxidante deste
397 nucleosídeo. Silva (2013) registrou baixa proporção de células
398 anormais e não observou a ação antioxidante significativa com
399 o uso do ácido ascórbico adicionado ao sêmen de ovinos.

400 A diminuição dos valores médios das variáveis
401 estudadas ao longo dos tempos de resfriamento pode estar
402 relacionada com o esgotamento das reservas energéticas e
403 nutricionais presentes no plasma seminal e diluente, bem como
404 pela diminuição do estoque de adenosina. Adicionalmente o
405 glicerol presente no diluidor base (Andromed ®) pode ter sido
406 tóxico com a prolongada exposição dos espermatozoides ao
407 resfriamento. Esta substância é classificada como um
408 crioprotetor penetrante e apesar de promover a proteção das
409 estruturas celulares, pode ocasiona efeitos deletérios como
410 estresse osmótico, mudanças na organização, fluidez e
411 permeabilidade da membrana plasmática e desorganização da
412 sua composição lipídica (Watson, 1995). No intuito de diminuir
413 os efeitos tóxicos do glicerol, alguns autores preferem adicionar
414 essa substância após a solução atingir 5 °C, ou seja, diluição em
415 duas etapas (Gil et al., 2003).

416 O maior tempo de resfriamento pode ter contribuído
417 para a formação de micelas invertidas, denominação atribuída à
418 forma cônica que certos fosfolipídios da membrana plasmática
419 dos espermatozoides assumem, com base hidrofóbica externa e
420 hidrofílica interna. No momento do aquecimento, este rearranjo
421 provoca a desestabilização, perturbação localizada e perda da
422 integridade da membrana (Parks e Graham, 1992; Parks, 1997;
423 Valle e Silva Filho, 2001).

424 **Conclusão**

425 A adenosina contribuiu para a melhoria da integridade
426 estrutural da membrana dos espermatozoides, bem como
427 melhorou os parâmetros físicos do sêmen resfriado de ovinos,
428 principalmente nas concentrações 0,5 e 0,75 %.

429 Com relação à motilidade dos espermatozoides, os
430 níveis recomendados (máximos) para o uso *in vitro* da
431 adenosina no sêmen resfriado de ovinos, de acordo com a
432 análise de regressão, foram de 0,81 e 1,04 % com 4 horas e 8
433 horas de resfriamento, respectivamente.

434 Dentre os tempos de resfriamentos estudados,
435 recomenda-se o resfriamento até 8 horas a 5 °C,
436 principalmente, com a adição de 0,75 % de adenosina ao
437 diluente.

438 *Financiamento*

439 Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de
440 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil
441 (CAPES) - Finance Code 001.

442 **Referências**

443 Affonso, F.J., Carvalho, H.F., Lançoni, R., Lemes, K.M., Leite,
444 T.G., Oliveira, L.Z., Celeghini, E.C.C., de Arruda, R.P.,
445 2017. Addition of Antioxidants Myoinositol, Ferulic Acid,
446 and Melatonin and Their Effects on Sperm Motility,
447 Membrane Integrity, and Reactive Oxygen Species
448 Production in Cooled Equine Semen. *J. Equine Vet. Sci.*
449 <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.09.006>

450 Aitken, R.J., 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm
451 function. *Reprod. Fertil. Dev.*
452 <https://doi.org/10.1071/RD9950659>

453 Allai, L., Druart, X., Contell, J., Louanjli, N., Moula, A. Ben,
454 Badi, A., Essamadi, A., Nasser, B., El Amiri, B., 2015.
455 Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris
456 or skim milk based extenders. *Anim. Reprod. Sci.*
457 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.07.003>

458 Almeida, C.G., De Mendonça, A., Cunha, R.A., Ribeiro, J.A.,
459 2003. Adenosine promotes neuronal recovery from
460 reactive oxygen species induced lesion in rat hippocampal
461 slices. *Neurosci. Lett.* [https://doi.org/10.1016/S0304-](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01478-7)
462 [3940\(02\)01478-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01478-7)

463 Ball, B.A., Vo, A.T., Baumber, J., 2000. Generation of reactive

- 464 oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*
465 62, 508–515. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.508>
- 466 Bellezza, I., Minelli, A., 2017. Adenosine in sperm physiology.
467 *Mol. Aspects Med.* 55, 102–109.
468 <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.009>
- 469 Burnstock, G., 1978. A basis for distinguishing two types of
470 purinergic receptor., in: *Cell Membrane Receptors for*
471 *Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach.*
472 [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(80\)90268-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(80)90268-6)
- 473 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA, 2013.
474 *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen*
475 *animal*, 3rd ed. CBRA, Belo Horizonte.
- 476 Fénichel, P., Gharib, a, Emiliozzi, C., Donzeau, M., Ménézo,
477 Y., 1996. Stimulation of human sperm during capacitation
478 in vitro by an adenosine agonist with specificity for A2
479 receptors. *Biol. Reprod.* [https://doi.org/10.1111/j.1526-](https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2011.01299.x)
480 [4637.2011.01299.x](https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2011.01299.x)
- 481 Fraser, L.R., 1990. Adenosine and its analogues, possibly
482 acting at A2 receptors, stimulate mouse sperm fertilizing
483 ability during early stages of capacitation. *J. Reprod.*
484 *Fertil.* <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0890467>
- 485 Fraser, L.R., Duncan, A.E., 1993. Adenosine analogues with
486 specificity for A2 receptors bind to mouse spermatozoa
487 and stimulate adenylate cyclase activity in uncapacitated
488 suspensions. *J. Reprod. Fertil.* 98, 187–194.

- 489 <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0980187>
- 490 Frazão Sobrinho, J.M., Castelo Branco, M.A., Sousa Júnior, A.,
491 Nascimento, I.M.R., Mota, L.H.C.M., Carvalho, Y.N.T.,
492 Ferreira, S.B., Costa, D.N.M., Moraes Júnior, F.J., Souza,
493 J.A.T., 2014. Características do sêmen de carneiros Dorper
494 Santa Inês e sem padrão racial definido, pré e pós-
495 congelação, nos períodos chuvoso e seco. *Arq. Bras. Med.*
496 *Vet. e Zootec.* <https://doi.org/10.1590/1678-6465>
- 497 Fredholm, B.B., Burnstock, G., Harden, T.K., Spedding, M.,
498 1996. Receptor nomenclature. *Drug Dev. Res.* 39, 461–
499 466. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-
500 2299\(199611/12\)39:3/4<461::AID-DDR28>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2299(199611/12)39:3/4<461::AID-DDR28>3.0.CO;2-2)
- 501 Gil, J., Rodriguez-Irazaqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L.,
502 Rodríguez-Martínez, H., 2003. Fertility of ram semen
503 frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial
504 insemination. *Theriogenology*.
505 [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01178-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01178-0)
- 506 Hancock, J.L., 1955. The morphology of boar spermatozoa. *J.*
507 *R. Microsc. Soc.* 76, 84–97.
508 [https://doi.org/doi/pdf/10.1111/j.1365-
509 2818.1956.tb00443.x](https://doi.org/doi/pdf/10.1111/j.1365-2818.1956.tb00443.x)
- 510 Harrison, R.A.P., 2003. Cyclic AMP signalling during
511 mammalian sperm capacitation - Still largely Terra
512 Incognita. *Reprod. Domest. Anim.*
513 <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00400.x>

- 514 Hoskins, D.D., Hall, M.L., Munsterman, D., 1975. Induction of
515 Motility in Immature Bovine Spermatozoa by Cyclic AMP
516 Phosphodiesterase Inhibitors and Seminal Plasma. *Biol.*
517 *Reprod.* 13, 168–176.
518 <https://doi.org/https://doi.org/10.1095/biolreprod13.2.168>
- 519 Liguori, L., de Lamirande, E., Minelli, A., Gagnon, C., 2005.
520 Various protein kinases regulate human sperm acrosome
521 reaction and the associated phosphorylation of Tyr
522 residues and of the Thr-Glu-Tyr motif. *Mol. Hum. Reprod.*
523 <https://doi.org/10.1093/molehr/gah154>
- 524 Maia, M.S., Medeiros, I.L., Lima, C.A.C., 2011. Características
525 reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil :
526 parâmetros seminais. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*
- 527 Masino, S.A., Mesches, M.H., Bickford, P.C., Dunwiddie, T.
528 V., 1999. Acute peroxide treatment of rat hippocampal
529 slices induces adenosine-mediated inhibition of excitatory
530 transmission in area CA1. *Neurosci. Lett.*
531 [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00693-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00693-X)
- 532 Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Tamayo-Canul,
533 J., López-Urueña, E., de Paz, P., Anel, L., Martínez-
534 Pastor, F., Álvarez, M., 2014. Refrigerated storage of ram
535 sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect
536 of temperature, extender and storage time. *Anim. Reprod.*
537 *Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.006>
- 538 Maxwell, W.M.C., Watson, P.F., 1996. Recent progress in the

- 539 preservation of ram semen, in: *Animal Reproduction*
540 *Science*. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01544-8](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01544-8)
- 541 Mayer, D.T., Squiers, C.D., Bogards, R., Oloufa, M.M., 1951.
542 The technique for characterizing mammalian spermatozoa
543 as dead or living by differential staining. *J. Anim. Sci.*
544 <https://doi.org/10.2527/jas1951.101226x>
- 545 Monks, N.J., Fraser, L.R., 1988. Inhibition of adenosine-
546 metabolizing enzymes modulates mouse sperm fertilizing
547 ability: a changing role for endogenously generated
548 adenosine during capacitation. *Gamete Res.* 21, 267–276.
549 <https://doi.org/10.1002/mrd.1120210308>
- 550 Parks, J.E., 1997. Hypothermia and Mammalian gametes, in:
551 Karow, A.M., Critser, J.K. (Eds.), *Reproduction Tissue*
552 *Banking: Scientific Principles*. Academic Press, San
553 Diego, pp. 229–261. [https://doi.org/10.1016/b978-](https://doi.org/10.1016/b978-012399770-8/50006-x)
554 [012399770-8/50006-x](https://doi.org/10.1016/b978-012399770-8/50006-x)
- 555 Parks, J.E., Graham, J.K., 1992. Effects of cryopreservation
556 procedures on sperm membranes. *Theriogenology*.
557 [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90231-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F)
- 558 Polosa, R., 2002. Adenosine-receptor subtypes: Their relevance
559 to adenosine-mediated responses in asthma and chronic
560 obstructive pulmonary disease. *Eur. Respir. J.* 20, 488–
561 496. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.01132002>
- 562 Polosa, R., Holgate, S.T., 2006. Adenosine receptors as
563 promising therapeutic targets for drug development in

- 564 chronic airway inflammation. *Curr Drug Targets*.
565 <https://doi.org/10.2174/138945006777435236>.
- 566 Rodrigues, L. F. S.; Freire, G. H. ; Vale, M. R., 2000. Multiple
567 Iso-forms of Caprine Adenosine Deaminase. *Israel Journal*
568 *Of Veterinary Medicine, Internacional*, 55, 135-138.
- 569 Santos, C., 2007. *Estatística descritiva: manual de auto-*
570 *aprendizagem. Sílabo, Lisboa*.
- 571 Shen, M. -R, Linden, J., Chen, S. -S, Wu, S. -N, 1993.
572 Identification of adenosine receptors in human
573 spermatozoa. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*.
574 <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1993.tb01736.x>
- 575 Smith, J.F., Murray, G.R., 1997. Evaluation of different
576 staining techniques for determination of membrane status,
577 in: *STAINING TECHNIQUES IN SPERMATOZA*. pp.
578 246–250.
- 579 Swanson, E., Bearden, H., 1951. An eosin-nigrosin stain for
580 differentiating live and dead bovine spermatozoa. *J. Anim.*
581 *Sci.* <https://doi.org/10.2527/jas1951.104981x>
- 582 Tash, J.S., Means, A.R., 1988. cAMP-dependent regulatory
583 processes in the acquisition and control of sperm flagellar
584 movement. *Prog. Clin. Biol. Res.* 267, 335–355.
- 585 Vadnais, M.L., Aghajanian, H.K., Lin, A., Gerton, G.L., 2013.
586 *Signaling in Sperm: Toward a Molecular Understanding*
587 *of the Acquisition of Sperm Motility in the Mouse*
588 *Epididymis1. Biol. Reprod.*

- 589 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110163>
- 590 Valle, G.R., Silva Filho, J.M., 2001. Membrana plasmática do
591 espermatozóide. *Cad. Técnicos Veterinária e Zootec.* 45–
592 53.
- 593 Watson, P.F., 1995. Recent developments and concepts in the
594 cryopreservation of spermatozoa and the assessment of
595 their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*
596 <https://doi.org/10.1071/RD9950871>
- 597 Zalata, A.A., Christophe, A.B., Depuydt, C.E., Schoonjans, F.,
598 Comhaire, F.H., 1998. White blood cells cause oxidative
599 damage to the fatty acid composition of phospholipids of
600 human spermatozoa. *Int. J. Androl.*
601 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1998.00112.x>
- 602 Zhendong Zhu, Rongnan Li, Gongzhen Ma, Wenjing Bai,
603 Xiaoteng Fan, Yinghua Lv, Jun Luo, Wenxian Zeng,
604 2018. 5'-AMP-Activated Protein Kinase Regulates Goat
605 Sperm Functions via Energy Metabolism In Vitro. *Cell*
606 *Physiol Biochem.* 47, 2420-2431.
607 <https://doi.org/10.1159/000491616>
- 608
- 609
- 610
- 611
- 612
- 613



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Projeto de Pesquisa**, intitulado “**Ação de um nucleosídeo purinérgico sobre a motilidade e vigor espermático em ovinos Santa Inês**”, protocolo nº 037/2017 (CEUA) e 23084.011913/2017-21 (UFRA), sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Rodrigues** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de **PESQUISA** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal Rural da Amazônia, em reunião de **29/09/2017**.

Vigência do projeto	29 de setembro 2017 a 01 de abril de 2018
Espécie/linhagem	<i>Ovis aries</i> (ovinos) / Santa Inês
Número de animais	7 (sete)
Peso/Idade	30 a 35 kg / 2 a 3 anos
Sexo	6 machos e 1 fêmea
Origem	Centro de Pesquisa em Caprinos e Ovinos – CPCOP / UFRA

Belém, 02 de outubro de 2017.

Prof.ª Maria Cristina Manno
Coordenadora CEUA/UFRA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
Av. Tancredo Neves, nº 2501, Bairro Montese, Belém – PA. CEP: 66.077-901
Contatos: (1)3210-5165 ceua@ufra.edu.br www.comissao.ufra.edu.br/ceua

