

SILDIVANE VALCÁCIA SILVA

**AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES OVINOS
CRIOPRESERVADOS EM TRIS-GEMA ACRESCIDO DE
ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS E NÃO-ENZIMÁTICOS**

RECIFE – PE

ABRIL – 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES OVINOS
CRIOPRESERVADOS EM TRIS-GEMA ACRESCIDO DE
ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS E NÃO-ENZIMÁTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para obtenção do grau de Doutora em Ciência Veterinária.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Madalena Pessoa Guerra

RECIFE – PE

ABRIL – 2010

Catálogo na fonte
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central - UFRPE

S586a Silva, Sildivane Valcácia

Avaliação de espermatozoides ovinos criopreservados em Tris-gema acrescido de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos/
Sildivane Valcácia Silva – 2010.
114 f. : il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra.

Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2010.

Referências

CDD 636.308926

1. Antioxidantes

2. Acrossoma

3. Membranas

4. Ultraestrutural

I. Guerra, Maria Madalena Pessoa, Orientadora

II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES OVINOS
CRIOPRESERVADOS EM TRIS-GEMA ACRESCIDO DE
ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS E NÃO-ENZIMÁTICOS**

Tese de Doutorado elaborada e defendida por

SILDIVANE VALCÁCIA SILVA

Aprovada em 30 de abril de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria Madalena Pessoa Guerra/UFRPE
Orientadora

Prof. Dr. Marc Roger Jean Marie Henry/UFGM

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro/UFRPE

Prof.^a Dr.^a Erika Christina Santos Oliveira/UFRPE

Dr.^a Catarina Raposo Dias Carneiro/CETENE-PE

*Como estiveres, Deus te guarde.
Como penses, Deus te use.
Onde te encontres, Deus te ilumine.
Com quem estejas, Deus te guie.
No que fizeres, Deus te ampare.
Em todos os teus passos, Deus te abençoe...*

Emmanuel

Psicografia de Francisco Cândido Xavier

*A todos os membros de minha família,
pela compreensão, companheirismo e amor
sempre...*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao nosso Pai maior, **DEUS**, pela oportunidade de nascer, crescer, desenvolver e ter saúde para poder realizar todas as etapas que passei. Ainda, ao meu querido **Anjo de guarda**, por sempre me orientar e proteger;

À professora Dra **Maria Madalena Pessoa Guerra**, por ter confiado em mim e permitido a realização do doutorado nesta instituição. Uma pessoa que admiro e amo por ensinar a respeitar o semelhante, preocupar-se com o crescimento de todos e pela simplicidade;

Aos amigos **Adriana, Álvaro, André Mariano, Andrea Vidal, Clarissa, Diogo, Felipe Panda, Fernanda, Filipe, Jobson, Kaline, Lígia, Lidiane, Lorena, Lúcia, Miss Ellen, Patrícia, Pedro Loiros Radianes, Prof.^a Érika, Shirlei, Victor**, pelas jornadas de trabalho, amizade, confiança, respeito e as risadas nos nossos almoços... Um brinde à família **ANDROLAB!**

Ao pessoal da Estação Experimental Benjamim Maranhão/EMEPA-PB: **Jefferson, Semírames, Fabiana, Gilvan, João Manoel, Givaldo, José Ailton, Robson, Valter, Marcelo e Antônio**. Sem eles o trabalho não teria sido tão fácil. Ainda, aos animais da EMEPA-PB, por existir, se adaptar ao trabalho e não adoecer;

Ao professor Dr. **José Ferreira Nunes**, por disponibilizar o Laboratório de Tecnologia do Sêmen da Universidade Estadual do Ceará (UECE) para a realização de uma das etapas deste trabalho, e a **Cibele Cavalcanti**, por nos ajudar na operacionalização inicial do CASA;

A Dra. **Christina Alves Peixoto**, por disponibilizar a MET do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) para a realização de uma das etapas deste trabalho e, em especial, a **Karina Saraiva**, por nos ajudar com o processamento das amostras, sempre com presteza, simplicidade e docilidade;

A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária, em especial a **Joana D'Arc da Rocha Alves, Sônia Maria Domingues e Alcir Loureiro**, pela ajuda com higienização de materiais e amizade no decorrer do Doutorado;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, em especial a **Tom Menezes**, pelas comunicações e auxílio nos documentos necessários e disciplinas durante o doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão de bolsa durante a realização do Doutorado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALH Amplitude de deslocamento lateral da cabeça	MP Motilidade Progressiva
AMPc Adenosina monofosfato cíclico	MT Motilidade Total
ATP Adenosina trifosfato	NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
BCF Frequência do Batimento de Flagelo	PBS Tampão fosfato salina
BSP Proteínas espermáticas de touros	PMM Potencial da Membrana Mitocondrial
CASA Sistema computadorizado de avaliação espermática	RNS Espécies Reativas ao Nitrogênio
CAT Catalase	ROS Espécies Reativas ao Oxigênio
CTC Clortetraciclina	SOD Superóxido Dismutase
DCF Diacetato de Carboxifluoresceína	STR Retilinearidade
DMSO Dimetilsulfóxido	TAC Capacidade Antioxidante Total
FITC-PNA Fluoresceína conjugada a <i>Peanut aglutinin</i>	VAP Velocidade de Trajeto
GSH Glutathiona Reduzida	VCL Velocidade Curvilínea
GSH-Px Glutathiona Peroxidase	VSL Velocidade Progressiva
GSH-Rd Glutathiona Redutase	WOB Índice de oscilação
GSSG Glutathiona Oxidada	
H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio	
IA Inseminação Artificial	
iAC Integridade de Acrossoma	
iMP Integridade de Membrana Plasmática	
IP Iodeto de Propídeo	
JC-1 iodeto de 5,5',6,6' tetracloro-1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolil	
LDF Fração de Baixa Densidade	
LIN Linearidade	
MET Microscopia Eletrônica de Transmissão	

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Anatomia descritiva do espermatozoide. Corte sagital da cabeça e cauda (A) e cortes transversais da cauda espermática (B)	19
Figura 2. Mecanismo de proteção espermática conferida por diluidores à base de gema de ovo e leite desnatado	30
Figura 3. Ciclo redox da Glutathione	37
Figura 4. Representação gráfica dos parâmetros quantitativos expressos pelo sistema CASA em uma trajetória irregular	46
Figura 5. Esquema da ação das sondas que são utilizadas em testes de integridade da membrana plasmática	49
Figura 6. Esquema de ação das sondas fluorescentes nas membranas acrossomais externa (MAE) e interna (MAI)	50
 Experimento 1	
Figura 1. Ultraestrutura de espermatozoides de reprodutores ovinos obtidos de sêmen <i>in natura</i> (A e B) e criopreservado (C, D, E, F, G e H) em diluente à base de leite desnatado e glicerol 5%. A – Corte longitudinal da cabeça mostrando membrana plasmática íntegra, com discreta ondulação (*); acrossoma íntegro; B – Corte longitudinal da peça intermediária evidenciando preservação das mitocôndrias (seta preta); C – Grupo GSH 7 mM: corte longitudinal da cabeça mostrando edema na membrana plasmática (*); D – Grupo Controle: corte longitudinal da cabeça apresentando vesiculação das membranas plasmática e acrossomal externa (seta branca); E – Grupo GSH 7 mM: corte transversal da cauda evidenciando vacuolização das mitocôndrias (seta preta); F – Grupo SOD 25 U/mL: corte transversal da cauda mostrando vacuolização das mitocôndrias (seta preta); G – Grupo SOD 100 U/mL: corte longitudinal da peça intermediária mostrando mitocôndrias íntegras (setas brancas); H - Grupo SOD 100 U/mL: corte longitudinal da cabeça evidenciando acrossoma (seta preta) e membranas plasmáticas intactos (seta cinza).....	91

Experimento 2

Figura 1. A – Espermatozoides *in natura*: corte transversal da cabeça espermática, região apical; membrana plasmática íntegra, com discreta ondulação (*); *perforatorium* (seta preta); B – Espermatozoides *in natura*: mitocôndrias íntegras (seta branca); C – Pós-descongelção, Grupo controle: corte longitudinal da cabeça espermática, vesiculações na região apical (seta preta); D – Grupo controle: corte longitudinal da cabeça do espermatozoide, com perda de acrossoma e exposição da zona equatorial (*) E – Grupo CAT 100 U/mL: lesão de acrossoma (seta preta); F – Grupo CAT 25 U/mL: preservação das membranas plasmáticas (*), acrossoma (seta branca) e mitocôndrias (setas pretas). G – Grupo controle: vacuolização mitocondrial (seta preta); H – Grupo CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL: membrana plasmática preservada e mitocôndrias íntegras (seta cinza).....

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Concentrações de Glutathiona no espermatozoide e plasma seminal de diferentes espécies de mamíferos	36
Tabela 2. Descrição dos parâmetros de velocidade qualitativa	46
Tabela 3. Média, desvio padrão (d.p), coeficiente de variação (CV), 1º e 3º quartis dos parâmetros cinéticos para sêmen <i>in natura</i> de ovinos Santa Inês avaliados em sistema CASA	47

Experimento 1

Tabela 1. Porcentual (\pm erro padrão) de espermatozoides ovinos da raça Santa Inês criopreservados em Tris-gema suplementado com SOD e GSH com integridade da membrana plasmática, acrossoma e alto potencial da membrana mitocondrial.....	88
Tabela 2. Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros cinéticos de espermatozoides de ovinos da raça Santa Inês submetidos à congelação em Tris-gema acrescido dos antioxidantes SOD e GSH	89
Tabela 3. Porcentual (média \pm erro padrão) de estruturas preservadas na cabeça de espermatozoides ovinos <i>in natura</i> ou congelado em Tris-gema, suplementado com SOD e GSH em diferentes concentrações, avaliado pela microscopia eletrônica de transmissão (MET)	90
Tabela 4. Porcentual (média \pm erro padrão) de estruturas preservadas na cauda de espermatozoides ovinos <i>in natura</i> ou congelado em Tris-gema, suplementado com SOD e GSH em diferentes concentrações, avaliado pela microscopia eletrônica de transmissão (MET)	90
Tabela 5. Número de estruturas colhidas e taxa de fertilização de ovelhas inseminadas com sêmen criopreservado em diluente à base de Tris-gema suplementado com SOD e GSH.....	92

Experimento 2

Tabela 1. Porcentual (\pm erro padrão) de espermatozoides ovinos da raça Santa Inês criopreservados em Tris-gema suplementado com Trolox, CAT e associação de CAT e SOD com integridade da membrana plasmática,	
---	--

acrossoma e alto potencial da membrana mitocondrial.....	110
Tabela 2. Valores (média ± erro padrão) dos parâmetros cinéticos de espermatozoides ovinos congelados em Tris-gema suplementado com os antioxidantes Trolox, CAT e associação de CAT e SOD.....	111
Tabela 3. Porcentual (média ± erro padrão) de estruturas preservadas na cabeça de espermatozoides ovinos <i>in natura</i> ou congelados em Tris-gema, suplementado com Trolox, CAT e associação de CAT e SOD, avaliado pela microscopia eletrônica de transmissão (MET)	112
Tabela 4. Porcentual (média ± erro padrão) de estruturas preservadas na cauda de espermatozoides ovinos <i>in natura</i> ou congelados em Tris-gema, suplementado com Trolox, CAT e associação de CAT e SOD, avaliado pela microscopia eletrônica de transmissão (MET)	112

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da adição dos antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathiona reduzida (GSH), catalase (CAT), vitamina E (Trolox), e a associação entre CAT e SOD ao diluente Tris-gema de congelação do sêmen ovino. Foram utilizados cinco reprodutores ovinos da raça Santa Inês, com histórico de fertilidade, sendo os ejaculados obtidos pelo método de vagina artificial. Os ejaculados foram avaliados e submetidos à formação do *pool*, diluído em Tris-gema e glicerol 5%, acrescido de antioxidantes de acordo com o experimento e o grupo experimental: Exp. 1 (G1= Controle; G2= 25 U/mL de SOD; G3= 50 U/mL de SOD; G4= 100 U/mL de SOD; G5= 2 mM de GSH; G6= 5 mM de GSH; G7= 7 mM de GSH) e Exp. 2 (G1= Controle; G2= 30 µM de Trolox; G3= 60 µM de Trolox; G4= 120 µM de Trolox; G5= 25 U/mL de CAT; G6= 50 U/mL de CAT; G7= 100 U/mL de CAT; G8= 25 U/mL de CAT + 100 U/mL de SOD), na concentração de 240×10^6 espermatozoides/mL. O sêmen foi acondicionado em palhetas (0,25 mL), congelado utilizando sistema automatizado e armazenado em nitrogênio líquido (- 196 °C). Após descongelação (37 °C/30 segundos), as amostras foram submetidas à análise de integridade da membrana plasmática (iMP), acrossoma (iAc) e potencial de membrana mitocondrial (PMM) com sondas fluorescentes; cinética espermática, pelo CASA; e ultraestrutura dos espermatozoides, por microscopia eletrônica de transmissão. No Exp. 1, foi realizada avaliação *in vivo*, com o sêmen utilizado em programa de transferência de embriões. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre grupos para motilidade total (MT), retilinearidade (STR) e índice de oscilação (WOB), sendo o GSH 7mM inferior ($P < 0,05$) na MT e superior na STR, e os grupos GSH 5 e 7 mM com maior ($P < 0,05$) WOB em comparação ao controle, SOD 25 e 100 U/mL. Na análise ultraestrutural, evidenciou-se que o acrossoma foi melhor preservado ($P < 0,05$), pós-congelação, nos grupos SOD 50 e 100 U/mL e GSH 2 e 5 mM, enquanto que o acrossoma e as mitocôndrias do grupo Controle, juntamente com o GSH 7 mM, sofreram maiores danos ($P < 0,05$). Para a fertilização *in vivo*, o grupo SOD conferiu resultados numericamente superiores aos grupos controle e GSH. Para o Exp. 2, o CAT 100 U/mL apresentou menor porcentual ($P < 0,05$) de espermatozoides com acrossoma íntegros. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre grupos na cinética espermática (motilidade progressiva, linearidade, retilinearidade, índice de oscilação, velocidade em linha reta e velocidade média do percurso), sendo superiores para os grupos Trolox 30 e 60 µM e inferiores para os grupos CAT 50 e 100 U/mL. Na avaliação ultraestrutural, os grupos CAT 50 e 100 U/mL apresentaram menor preservação ($P < 0,05$) do acrossoma, enquanto o CAT 25 U/mL foi superior ($P < 0,05$) ao CAT 100 U/mL para a preservação da membrana plasmática e o SOD 25 U/mL foi inferior ($P < 0,05$) aos demais grupos na preservação da mitocôndria. Assim, conclui-se que a adição de GSH na concentração de 7mM e CAT 50 e 100 U/mL não preservam a integridade estrutural de espermatozoides ovinos pós-criopreservação; a adição de SOD 100 U/mL, Trolox 60 e 120 µM, e a associação de CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL proporcionam maior preservação das membranas de espermatozóides congelados de ovinos.

Palavras-chaves: antioxidantes, acrossoma, membranas, ultraestrutural.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of addition of antioxidants superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), catalase (CAT), vitamin E (Trolox), and the association between CAT and SOD to Tris egg-yolk ram semen freezing extender. We used five Santa Inês breed rams, with history of fertility, and the ejaculates obtained by artificial vagina. The *pool* of semen samples were diluted in Tris egg-yolk plus glycerol 5% supplemented with antioxidants, according to the experiments and experimental groups: Exp 1 (G1= control group, G2= 25 U/mL SOD; G3= 50 U/mL SOD; G4= 100 U/mL SOD; G5= 2 mM GSH; G6= 5 mM GSH and G7= 7 mM GSH) and Exp 2 (G1= control group, G2= 30 µM Trolox, G3= 60 µM Trolox, G4= 120 µM Trolox, G5= 25 U/mL CAT, G6= 50 U/mL CAT; G7= 100 U/mL CAT, G8= 100 U/mL SOD + 25 U/mL CAT), at concentration of 240×10^6 spermatozoa/mL. Semen was stored in straws (0.25 mL), frozen using an automated system and stored in liquid nitrogen (-196 °C). After thawing (37 °C/30 seconds), samples were analyzed for plasma membrane integrity (iMP), acrosome (IAC) and mitochondrial membrane potential (MMP) with fluorescent probes, kinematics sperm by CASA, and ultrastructure spermatozoa by transmission electron microscopy (TEM). In Exp 1, evaluation was performed *in vivo*, with the semen used in embryo transfer program. In the Exp 1, significant differences ($P < 0.05$) were observed among groups for total motility (MT), straightness (STR) and oscillation index (WOB) and the GSH 7 mM was lower in MT and higher in STR, and GSH 5 e 7 mM groups were greater in WOB when compared to control, SOD 25 and 100 U/mL. Ultrastructure study showed acrosome better ($P < 0.05$) preserved after freezing in SOD (50 and 100 U/mL) and GSH (5 and 7 mM), whereas mitochondria from control group together with 7 mM GSH suffered further damage. The plasma membrane remained preserved after freezing, regardless of group. For *in vivo* fertilization, SOD group gave better results than GSH ($P > 0.05$). For Exp 2, CAT 100 U/mL showed a lower percentage ($P < 0.05$) of spermatozoa with intact acrosome. Significant differences ($P < 0.05$) were observed among groups on the kinematics sperm (progressive motility, linearity, straightness, oscillation index, straight line velocity and velocity average path), and were higher for Trolox (30 and 60 µM) and lower for CAT (50 and 100 U/mL). On ultrastructural evaluation, CAT (50 and 100 U/mL) had lower acrosome preservation ($P < 0.05$) and CAT 25 U/mL was higher ($P < 0.05$) than CAT 100 U/ml for the preservation of plasma membrane. Thus, we conclude that the addition of GSH at a concentration of 7mm and 50 CAT and 100 U/mL do not preserve the structural integrity of spermatozoa after cryopreservation; the addition of SOD 100 U/mL, Trolox 60 and 120 mM, and association of CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL provide better preservation of sperm membranes of ram after freezing.

Keywords: antioxidants, acrosome, membranes, ultrastructure.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 A Célula Espermática	18
2.2 Capacitação Espermática	21
2.3 Utilização do Sêmen	23
2.4 Criopreservação	25
2.4.1 Efeitos da criopreservação.....	26
2.4.2 Redução das crioinjúrias.....	28
- Crioprotetores não penetrantes.....	28
- Crioprotetores penetrantes.....	31
2.5 Antioxidantes	32
2.5.1 Catalase.....	33
2.5.2 Glutationa.....	35
2.5.3 Superóxido dismutase.....	38
2.5.4 Vitamina E.....	40
2.6 Avaliação Espermática	43
2.6.1 Integridade de membranas espermáticas.....	48
2.6.2 Avaliação ultraestrutural.....	51
2.6.3 Avaliação <i>in vivo</i>	53
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
4 EXPERIMENTOS	70
4.1 Experimento 1	71
4.2 Experimento 2	93
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	114

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma das primeiras explorações animais feitas pelo homem, há mais de 4.000 anos a.C., na Ásia Central, visando a produção de alimentos na forma de carne e leite, assim como de outros produtos, como lã e pele (VIANA, 2008).

No Brasil, foi uma das primeiras espécies exóticas a ser introduzida pelos colonizadores portugueses. Segundo o IBGE (2008), o efetivo do rebanho ovino no país é de 16.019.170 cabeças e a região Nordeste tem um efetivo correspondente a 58,5% de todos os ovinos criados no Brasil. Entretanto, nesta região, em decorrência do sistema extensivo de criação, associado às condições adversas do semiárido, os ovinos sofreram seleção natural ao longo dos séculos. Tal seleção levou ao desenvolvimento de animais cujas principais características são rusticidade, boa capacidade de reprodução e pele de ótima qualidade, porém tardios, de porte reduzido e carcaça inferior (SIMPLÍCIO, 2008).

Tentativas de melhoramento genético do rebanho ovino no Nordeste têm sido realizadas, do ponto de vista étnico, inclusive com a introdução de raças exóticas. Todavia, a tendência atual é o reconhecimento do potencial da ovinocultura nordestina brasileira, selecionando-se para isso os melhores animais dentro de raças e/ou tipos nativos já adaptados. Neste contexto, a raça Santa Inês destaca-se por constituir a maior população de ovinos controlados pela Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (AZEVEDO, 2004).

Desta forma, várias biotecnologias como a criopreservação de gametas masculinos e a inseminação artificial vêm sendo desenvolvidas e aplicadas à criação de ovinos, com o intuito de fornecer subsídios para o crescimento efetivo da ovinocultura no Nordeste brasileiro. Entretanto, procedimentos convencionais de criopreservação de sêmen causam extensivos danos químicos e físicos às membranas espermáticas extra e intracelulares, os quais são atribuídos a alterações na transição da fase lipídica e/ou aumento na peroxidação (PURDY, 2006), durante os processos de congelamento/descongelamento, com a consequente redução na porcentagem de espermatozoides móveis, velocidade e capacidade fertilizante (ISACHENKO et al., 2004).

Conhecimentos sobre os danos oxidativos causados às células espermáticas decorrentes do desequilíbrio entre as concentrações fisiológicas de oxidantes e antioxidantes, resultantes do aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio

(ROS) ou da redução da capacidade antioxidante total (TAC) do sêmen, podem fornecer importantes informações para melhorar a viabilidade espermática pós-congelação de várias espécies de animais domésticos (GUERRA et al., 2004).

Em virtude da conhecida ação das ROS sobre a célula espermática, a padronização de protocolos para a criopreservação do espermatozoide se faz necessária, assim como a identificação de antioxidantes que possam ser utilizados para equilibrar a ação dos oxidantes produzidos durante os procedimentos de conservação do material biológico de animais da espécie ovina. Assim, objetivou-se com este trabalho identificar a ação dos antioxidantes enzimáticos (Catalase e Superóxido Dismutase) e não enzimáticos (Glutathiona Reduzida e Vitamina E) na criopreservação do sêmen de carneiros da raça Santa Inês.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Célula Espermática

Com o objetivo de combater a teoria da “geração espontânea” ou Abiogênese defendida por John T. Needham (1713-1781), Lazzaro Spallanzani (1729-1799) iniciou suas investigações em busca de elucidar a vida microscópica (UZUNIAN et al., 1991). Experimentos importantes foram desenvolvidos por Spallanzani para estabelecer os papéis biológicos dos espermatozoides e do líquido seminal. Utilizando bexigas de porco para confeccionar calças contraceptivas para rãs machos, impediu que o fluido reprodutor destes alcançassem os óvulos de rãs fêmeas, culminando em ovos sem desenvolvimento. Entretanto, apenas em 1841, Albrecht Von Kölliker (1817-1905) reconheceu os espermatozoides como células (BURKHEAD et al., 2009).

Embora a descoberta do espermatozoide seja antiga, muitos processos relacionados à sua fisiologia ainda são desconhecidos, devido a escassas informações sobre a interação celular/molecular entre os gametas masculino e feminino (TOSHIMORI e ITO, 2003). Sabe-se que os espermatozoides são produzidos nos testículos pelo processo denominado espermatogênese e, nestas gônadas, estes gametas apresentam-se imóveis e são inábeis para se ligar ao oócito, necessitando passar pelo processo de maturação nos epidídimos e, após a ejaculação, pelo processo de capacitação no trato reprodutor da fêmea (YANAGIMACHI, 1994).

O espermatozoide mamífero é constituído por cabeça, colo e cauda (Figura 1) (HAFEZ e HAFEZ, 2004), apresentando diferentes composições físico-químicas em cada segmento ou domínio (CORREIA e CORREIA, 1985). Segundo Pesch e Bergmann (2006), o comprimento da célula espermática é espécie-específico, com variações entre 50 μm (suínos) a 90 μm (bovinos), enquanto o espermatozoide ovino possui, aproximadamente, 68 μm .

Na cabeça espermática, estão localizados o acrossoma e o núcleo. O acrossoma desenvolve importante papel na ligação do espermatozoide com a zona pelúcida do oócito durante o processo de fertilização (ABOU-HAILA e TULSIANI, 2000). Assim, em virtude de ser uma organela oriunda do complexo de Golgi, contém enzimas como as glicohidrolases, proteases e esterases, essenciais à digestão da zona pelúcida e

subsequente exposição do envelope nuclear, para liberação do conteúdo genético masculino, após contato com o oolema (GADELLA, 2008).

O colo é uma peça articular entre a cabeça e a cauda do espermatozoide. A cauda é a maior parte da célula espermática e é subdividida em peça intermediária, peça principal e peça final. A peça intermediária tem 5 μm de comprimento, aproximadamente e é caracterizada por uma bainha mitocondrial, constituída por mitocôndrias dispostas na forma helicoidal, envolvendo o complexo axonemal e as nove fibras densas externas (PESCH e BERGMANN, 2006). As mitocôndrias são responsáveis pela produção de maior parte da energia a partir da geração de ATP, possibilitando o movimento do espermatozoide (CÂMARA e GUERRA, 2008).

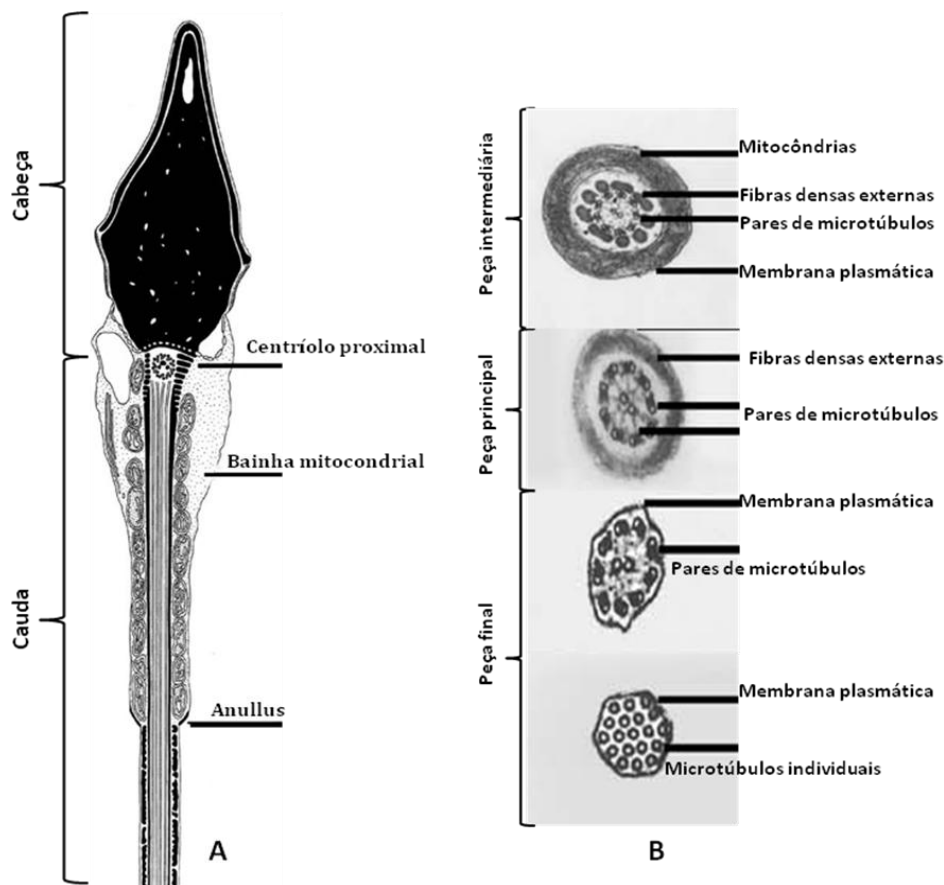


Figura 1. Anatomia descritiva do espermatozoide. Corte sagital da cabeça e cauda (A) e cortes transversais da cauda espermática (B). Fonte: adaptado de Pesch e Bergmann (2006).

A peça intermediária é finalizada por uma estrutura denominada de *annulus* ou anel de Jensen, que se apresenta densa e firmemente aderida à membrana plasmática do flagelo, cuja função não está bem definida. Entretanto, acredita-se que o *annulus* previna o deslocamento caudal das mitocôndrias durante o batimento do flagelo (SI e OKUNO, 1993). A peça principal é o segmento mais longo da cauda, constituído pelas

fibras densas externas e o axonema. A peça final, por sua vez, é marcada pela perda da estrutura do axonema, onde os nove pares de microtúbulos tornam-se 18 microtúbulos individuais (PESCH e BERGMANN, 2006).

Correia e Correia (1985) descreveram que a motilidade espermática é consequência da contractilidade do flagelo, promovida pela ação de proteínas presentes na cauda espermática. Desta forma, os ciclos de contração/relaxamento da cauda espermática resultam da atividade da ATPase, enzima que utiliza o ATP como substrato para produção de energia. Todavia, o metabolismo espermático ocorre de forma aeróbica e anaeróbica. Assim, em ambiente anaeróbico, a frutose é essencial para o metabolismo da célula espermática, e com a redução deste açúcar, a via anaeróbica deixa de produzir energia, recorrendo à parcial oxidação do ácido láctico (respiração exógena) e oxidação de componentes lipídicos intracelulares (respiração endógena).

A membrana plasmática é altamente especializada, com papel ativo na capacidade fertilizante da célula espermática, recebendo sinais que a modificam ao longo do processo da espermatogênese, trânsito e armazenamento nos epidídimos, ejaculação e depósito no trato genital feminino (LENZI et al., 1996). Estas modificações são caracterizadas pela mobilidade de proteínas integrais presentes na membrana, o que interfere diretamente na fluidez e, conseqüentemente, na permeabilidade celular (HOLT, 2000).

Segundo Valle e Silva Filho (2001), a passagem e a maturação dos espermatozoides mamíferos no epidídimo são acompanhadas por mudanças morfológicas e químicas da membrana, como o acúmulo de ácido siálico (carboidrato associado à glicoproteína) na superfície membranar, tornando o espermatozoide negativamente carregado, resultando em atração e adsorção de proteínas em regiões específicas da membrana plasmática.

Acreditava-se que o espermatozoide, uma vez formado, possuía a energia necessária ao desempenho de suas funções específicas. No entanto, sabe-se que as células espermáticas são capazes de efetuar trocas com o meio (plasma seminal) ou com o ambiente enriquecido de substâncias nutritivas e protetoras (MIES FILHO, 1982).

Segundo Correia e Correia (1985), o plasma seminal, produzido pelas glândulas acessórias (próstata, bulbouretrais e glândulas vesiculares), contém diferentes componentes, como açúcares, ácido cítrico, minerais e proteínas, correspondendo aos constituintes orgânicos do fluido seminal. A principal fonte de energia para a célula espermática são os açúcares presentes no plasma seminal, e, provavelmente, a frutose é

o primeiro açúcar a reduzir sua concentração, associado ao acúmulo de ácido láctico (CORREIA e CORREIA, 1985).

As proteínas, entretanto, são encontradas em maior quantidade (BIANCHI et al., 2008), com composição, conformação e tamanho específicos para cada espécie, e estabilidade dependendo das condições qualitativas do sêmen (JELÍNKOVÁ et al., 2003) e das variáveis climáticas (SOUZA et al., 2009). Segundo Souza et al. (2009), proteínas presentes no plasma seminal também apresentam função decapacitante, ou seja, evitam a capacitação espermática precoce. Estas proteínas, de baixo peso molecular, são conhecidas como caltrinas e agem na prevenção do aumento da concentração do íon cálcio na célula espermática. As caltrinas são removidas ou modificadas pelos fluidos do sistema reprodutor feminino, durante a capacitação espermática e a fecundação (FRAZER et al., 1996).

2.2 Capacitação Espermática

A capacitação espermática é um processo biológico que envolve múltiplas etapas, iniciadas por alterações bioquímicas e estruturais da membrana plasmática dos espermatozoides. Tais modificações afetam a estrutura e a permeabilidade da membrana plasmática, intrinsecamente relacionada com mudanças na concentração de íons do meio intracelular, metabolismo e motilidade da célula espermática (ABOU-HAILA e TULSIANI, 2000). A função deste evento sequenciado é fornecer fluidez necessária às membranas para que ocorra hiperativação da motilidade e fusão entre as membranas plasmática e acrossomal externa, evento denominado de vesiculação, resultando na reação acrossômica (SENGER, 2003).

Embora sejam estabelecidas as etapas e as funções da capacitação, as bases moleculares não foram totalmente elucidadas (VISCONTI e KOPF, 1998). Como limitação, a maioria dos experimentos é desenvolvida em roedores (NEILL e OLDS-CLARKE, 1987; BURKS e SALING, 1992), o que pode indicar variações ao se comparar diferentes espécies. Segundo FERRARI (1997), acredita-se que um dos principais eventos que ocorre na capacitação é a remoção e/ou alteração de estabilizadores ou fatores protetores da membrana plasmática, adquiridos durante a maturação epididimária ou no contato com o plasma seminal. Estas mudanças resultam na condição ideal para que ocorra fertilização e ligação espermatozoide-oócito. Diversas substâncias presentes nas secreções uterinas e tubáricas desencadeiam a capacitação

espermática, destacam-se o bicarbonato, albumina, progesterona, íon cálcio, glicosaminoglicanos e ROS (FLESH e GADELLA, 2000).

O íon bicarbonato ativa a adenilciclase na forma solúvel, ocasionando aumento das concentrações de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que estimula a proteína quinase “A” na indução da fosforilação da tirosina em vários substratos, metabolização de proteínas da matriz extracelular e membrana, com exposição dos sítios de ligação à zona pelúcida (GADELLA, 2008). A albumina age na redistribuição e extração do colesterol da membrana, aumentando sua atividade fusogênica e permeabilidade iônica, predispondo a célula à reação acrossômica e hiperativação da motilidade (De LAMIRANDE et al., 1997; FLESH e GADELLA, 2000). O hormônio progesterona estimula a capacitação espermática pela ativação dos canais de cálcio, diferente do estradiol que estabiliza a membrana plasmática (LUKOSEVICIUTE et al., 2005). O cálcio excita a adenilciclase no mecanismo semelhante ao íon bicarbonato, com o objetivo de aumentar as concentrações de AMPc, que, por sua vez, atua na peça intermediária dos espermatozoides para iniciar a hipermotilidade, movimento vigoroso e circular responsável pela impulsão do gameta masculino para o encontro com o oócito (SENGER, 2003).

Os glicosaminoglicanos são carboidratos presentes na matriz extracelular. Segundo Ax e Lenz (1987), estes carboidratos são marcadores que monitoram diferenças na fertilidade entre touros, sendo os mais conhecidos a heparina, o ácido hialurônico, o sulfato de Heparan e o sulfato de condroitina B. Os glicosaminoglicanos semelhantes à heparina participam da capacitação do espermatozoide de touros (PARRISH et al., 1989), visando aumentar o pH intracelular, por aumento do influxo de cálcio na célula, através da fosforilação da tirosina (VISCONTI et al., 2002).

Sob condições aeróbicas, as células produzem radicais livres ou espécies reativas ao oxigênio - ROS (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Da mesma forma, em geral, na célula espermática a produção de ROS é originada de sua atividade metabólica normal, e, em menor proporção, da fosforilação de proteínas do sistema reprodutor feminino durante o processo de capacitação. Na espécie equina, Baumber et al. (2000) afirmaram que concentrações elevadas de ROS são prejudiciais à atividade fisiológica espermática. Entretanto, posteriormente constatou-se que concentrações reduzidas de ROS promovem a função espermática equina, especificamente na capacitação espermática, reação acrossomal e hiperativação (BAUMBER et al., 2003). Desta forma, as ROS, tais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico em baixas

concentrações induzem a fosforilação da tirosina, expressão dos receptores de progesterona e hiperativação (BALL et al., 2002). Rivlin et al. (2004) avaliaram a adição de peróxido de hidrogênio no ejaculado de bovinos e observaram que 50 μM de H_2O_2 aumentaram a quantidade de AMPc, semelhante à ação do bicarbonato, sugerindo que concentrações reduzidas de H_2O_2 são benéficas para a capacitação espermática, enquanto o seu aumento inibe o processo, reduzindo consideravelmente os índices de fertilidade.

Outro processo envolvido na cascata que desencadeia a capacitação e promove a interação dos gametas é a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado para produzir hidroperóxido lipídico como produto primário inicial (AGARWAL et al., 2007). Nos sistemas biológicos, a lipoperoxidação pode ocorrer principalmente por via enzimática, pela ação das ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos ácidos graxos, e não enzimática, com atuação das ROS, espécies reativas ao nitrogênio (RNS), metais de transição e outros radicais livres (LIMA e ABDALLA, 2001).

Kodama et al. (1996), pesquisando o efeito da peroxidação lipídica dos espermatozoides sobre a taxa de fertilização em oócitos de camundongos, constataram aumento de até 50% do potencial fertilizante destes gametas. Todavia, este resultado não foi associado aos índices de motilidade (porcentagem, linearidade, velocidade e hiperativação) ou capacitação espermática prematura, mas ao aumento de até 4,6 vezes da formação de peróxidos lipídicos, o que proporcionou maior ligação da célula espermática à zona pelúcida.

2.3 Utilização do Sêmen

Segundo Castelo et al. (2008), os ejaculados da maioria dos animais domésticos contêm maior quantidade de espermatozoides do que o necessário para a fecundação. Desta forma, segundo estes autores, o processo de diluição do sêmen pode contribuir para o aproveitamento de um ejaculado para um maior número de fêmeas.

De acordo com as utilizações, o sêmen pode ser classificado em fresco ou *in natura*, o qual é colhido, analisado e fracionado sem utilização de artifícios para preservar o material fecundante; *in natura* diluído, que compreende as amostras colhidas, analisadas e acrescidas de diluente específico com o objetivo de aumentar o volume, proporcionando uma concentração de espermatozoides homogênea (BICUDO

et al., 2003). Em trabalho com sêmen equino, não foi observada diferença entre diluentes utilizados na diluição do sêmen *in natura* (FURTADO et al., 1999). Os mesmos resultados foram encontrados na espécie ovina, após inseminação por via transcervical, com taxas de prenhez próximas a 90,0% (SANTOS et al., 2009), similares aos índices obtidos com a monta natural (MIES FILHO, 1982).

Sêmen refrigerado é aquele colhido, analisado e diluído, com finalidade de proteção aos espermatozoides durante a redução da temperatura a 5 °C, além de atuar como expensor do volume seminal, facilitando seu fracionamento (BICUDO et al., 2003). A redução do metabolismo das células espermáticas a uma curva de temperatura controlada diminui o choque térmico (KUMAR et al., 2003) e mantém a integridade das células espermáticas por períodos de até 48 horas, possibilitando seu transporte a longas distâncias. Sousa e Bicudo (2003) reportaram índices de prenhez para a espécie ovina similares após inseminação artificial (IA) realizada com sêmen *in natura* e/ou refrigerado. Milczwski e Kozicki (2000), ao utilizarem sêmen ovino refrigerado, obtiveram diferentes resultados em decorrência do local de deposição, sendo mais satisfatória a inseminação intrauterina, comparada à cervical. Estes achados também foram observados por Machado et al. (2006). Estes autores enfatizaram que é viável preservar por certo período a qualidade do sêmen refrigerado, sendo os resultados de prenhez mais influenciados pela via de inseminação e local de deposição do sêmen do que pelos diluentes adicionados.

Sêmen congelado é a amostra que foi colhida, analisada, conservada e estocada em nitrogênio líquido à temperatura de -196 °C, possibilitando sua conservação e utilização por tempo indeterminado (CARNEIRO et al., 2007). Na utilização do sêmen congelado, entretanto, o índice de prenhez obtido é inferior ao encontrado quando do uso de ejaculados *in natura* ou após processo de refrigeração. LUZ et al. (2000), em trabalho de campo, observaram que a motilidade espermática pós-descongelamento estava relacionada com os índices de prenhez obtido. Estes ressaltaram que após a descongelamento, o índice de motilidade espermática deve ser superior a 40,0% visando obter taxa de prenhez superior a 50,0%, enquanto que motilidade espermática inferior a 40,0% reduz para 15,0% o percentual de fêmeas ovinas prenhes.

Em contrapartida, segundo Gilberti e Monreal (2008), o momento da inseminação é mais importante para a taxa de fertilidade do que o tipo de sêmen utilizado. Estes autores testaram diferentes momentos para a deposição do sêmen congelado no útero de fêmeas da raça Santa Inês (48, 60 e 72 horas após a remoção do

ressário) em programas de sincronização de cio e observaram taxa de prenhez inferior ao controle (sêmen *in natura*) quando a IA foi realizada 72 horas após a remoção do pessário.

Analisando os trabalhos realizados com as diferentes apresentações de sêmen, em relação ao estado de conservação, foi observado que partidas congeladas apresentam índices de gestação inferiores, quando comparados aos obtidos utilizando ejaculados *in natura* diluído e refrigerado (CARNEIRO et al., 2007). Desta forma, é imprescindível estudar a interferência da criopreservação sobre a célula espermática, avaliando quais os fatores que reduzem a viabilidade do espermatozoide, quando submetido a baixas temperaturas, nos parâmetros de fertilidade.

2.4 Criopreservação

Criobiologia é o ramo da biologia que estuda os efeitos de baixas temperaturas em células, tecidos e organismos vivos. Na prática, a criobiologia estuda compostos ou sistemas biológicos submetidos a temperaturas inferiores às fisiológicas para cada organismo. Com o resultado dos conhecimentos da criobiologia, desenvolveu-se a criopreservação, que é a tecnologia através da qual células, tecidos ou embriões são preservados a temperaturas abaixo do ponto de congelação da água, tendo como premissa a preservação da composição e da viabilidade das células por tempo indefinido (PEGG, 2002).

O processo de criopreservação requer que as amostras de espermatozoides sejam submetidas a refrigeração moderada e controlada, visando preservar a sua função, que é a fecundação do oócito (HOLT, 2000). Segundo Kumar et al. (2003), o controle na redução da temperatura diminui a possibilidade de perda da viabilidade celular, por diminuir a formação de grandes cristais de gelo no interior da célula. Diversos estudos sugerem que espermatozoides de diferentes espécies possuem propriedades criobiológicas específicas e graus de sensibilidade variados para a manipulação experimental, choque térmico (transições da fase lipídica), congelamento e tolerância osmótica (LADHA, 1998; WATSON, 2000; PURDY, 2006). Além de diferenças espécie-específicas, são observadas variações entre indivíduos, ejaculados de um mesmo indivíduo e dentro de um mesmo ejaculado, variações entre subpopulações espermáticas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003), o que explica as respostas

diversificadas à criopreservação de sêmen de um mesmo reprodutor (PETRUNKINA, 2007).

2.4.1 Efeitos da criopreservação

O processo de criopreservação espermática, além de possibilitar sua utilização por período relativamente longo (refrigeração) ou indeterminado (congelamento), reduz riscos e custos com aquisição e transporte de reprodutores, além de favorecer rápida difusão de material genético entre locais distantes (CASTELO et al., 2008). Todavia, a criopreservação de sêmen é um processo que promove grande estresse celular, e impõe aos espermatozoides condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade (PURDY, 2006).

O termo choque térmico define um conjunto de alterações ocorridas na célula espermática de mamíferos submetida à refrigeração rápida da temperatura corpórea ($\pm 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) a temperaturas próximas a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, resultando no decréscimo irreversível da motilidade espermática, assim como em mudanças na bioquímica e no funcionamento destes gametas, incluindo: redução da taxa de glicólise, respiração celular e frutólise, aumento da degeneração do ácido desoxirribonucleico e liberação de material intracelular (WATSON, 2000).

Outro ponto crítico da criopreservação é o “efeito solução”, caracterizado pela desidratação excessiva da célula, elevada concentração de solutos, modificação do pH e consequente alteração na função do espermatozoide (FAHY, 1980). Segundo Watson (1995), quando a célula espermática é submetida à congelamento lenta há tempo suficiente para que grande quantidade de água intracelular migre para o ambiente extracelular, estabelecendo o equilíbrio entre solvente e soluto. Desta forma, torna-se estritamente necessária a descongelamento na mesma intensidade, ou seja, de forma lenta, para que a célula ao ser reidratada, não sofra rompimentos das membranas biológicas pela rápida reconstituição do volume intracelular.

O processo de congelamento rápido, aliado à descongelamento lenta, implicará em danos causados pela formação de pequenos cristais de gelo que podem se agrupar formando cristais grandes, que rompem a membrana (WATSON, 2000). Importante salientar que a curva de congelamento ideal deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozoides se desidratem e rápida o bastante para evitar que as células espermáticas fiquem expostas por muito tempo às elevadas concentrações de soluto (SNOECK, 2003).

Segundo Ladha (1998), a membrana plasmática de espermatozoides é rica em fosfolipídeos e fisiologicamente assimétrica, com fosfatidilcolina e esfingomielina localizadas no folheto externo da bicamada lipídica, enquanto fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina encontram-se situadas no folheto interno. Durante a criopreservação, a membrana plasmática sofre modificações para se adequar às mudanças de temperatura, como o movimento de translocação de fosfolipídeos, com externalização da fosfatidilserina. Transformações ocorridas nas membranas espermáticas durante o procedimento de congelação/descongelação assemelham-se às alterações fisiológicas da capacitação (SILVA et al., 2009a).

No entanto, os mecanismos envolvidos na troca dos lipídeos entre os folhetos interno e externo da membrana plasmática, como a fosforilação da tirosina e efluxo de colesterol, observados nos espermatozoides criopreservados (SILVA e GADELLA, 2006), diferem daqueles observados no processo fisiológico da capacitação. Segundo Thomas et al. (2006), semelhante à capacitação, a criopreservação provoca na membrana plasmática estado de maior fluidez e exposição a sítios de ligação a moléculas externas, requerendo menor tempo para a célula se capacitar.

Os efeitos tóxicos do oxigênio são resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos, principalmente ácidos graxos poli-insaturados, mediada por ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (GILLE e SINGLER, 1995). A reação destas espécies com os ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, desencadeia o processo denominado peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que pode ser avaliado e utilizado como indicador do estresse oxidativo celular (WILLIAMS e FORD, 2005).

Segundo Jones e Mann (1977), o espermatozoide ovino é altamente susceptível à peroxidação dos fosfolipídeos presentes na membrana plasmática, ocasionando extensas alterações estruturais, especialmente na região acrossomal, perda rápida e irreversível da motilidade espermática, modificações no metabolismo da célula e do conteúdo intracelular. Neid et al. (2002) observaram que a célula espermática de equinos, quando congelada/descongelada, sofre maior ação da peroxidação lipídica do que a célula refrigerada ou não exposta à criopreservação. Estes resultados também foram encontrados no sêmen de bubalinos (KADIRVEL et al., 2009). Sabe-se que a presença das duplas ligações nas moléculas da membrana plasmática faz com que haja vulnerabilidade da célula espermática à ação das ROS, iniciando a cascata da

lipoperoxidação, com o objetivo de estabilizar os elétrons desemparelhados destes radicais (IRVINE, 1996).

2.4.2 Redução das crioinjúrias

Crioprotetor é a nomenclatura dada a qualquer substância que ofereça, temporariamente, energia, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada (PURDY, 2006). Com o intuito de reduzir os danos causados às células durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se bons crioprotetores. Os crioprotetores utilizados na congelação de sêmen das mais variadas espécies têm a função de evitar a formação de cristais grandes de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico através da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelação da água, assim como servir de tampão para ajustes de possíveis alterações do potencial de Hidrogênio - pH (MEDEIROS et al., 2002).

Os componentes do diluente de criopreservação são classificados como extracelulares ou não penetrantes, os quais são representados por macromoléculas com peso molecular elevado, tais como açúcares complexos (rafinose, trealose), lipoproteínas da gema do ovo, água de coco (NUNES, 2002), proteínas do leite e alguns aminoácidos, que atuam através de efeito osmótico, induzindo a saída de água do interior da célula e prevenindo a formação de cristais de gelo no meio intracelular (AMANN e PICKETT, 1987); e intracelulares ou penetrantes, os quais foram classificados por Ashwood-Smith (1987) em dois grupos: alcoólicos e amidas (ALVARENGA et al., 2005). Dentre os crioprotetores alcoólicos utilizados para a preservação espermática, destacam-se, especialmente, o glicerol, o etilenoglicol e o DMSO (FICKEL et al., 2007); entre as amidas citam-se a acetamida, a lactamida (KASHIWAZAKI et al., 2006), a dimetilformamida (OLIVEIRA et al., 2006) e a dimetilacetamida (CALDERAM et al., 2008).

- Crioprotetores não penetrantes

A composição da gema do ovo é bastante variável, uma vez que é um composto de origem animal e que pode ter diferentes composições de acordo com as práticas de manejo alimentar utilizadas na criação das aves (BRAGA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2007). Segundo Barreto et al. (2006), a gema do ovo apresenta a seguinte composição:

49,0% de umidade e 51,0% de sólidos totais, sendo que, destes, 30,9% são lipídeos totais. Todavia, a gema de ovo não é inteiramente definida, sendo um composto biológico que contém proteínas, vitaminas, fosfolipídeos, glicose, componentes bactericidas e antioxidantes (HOUPALATHI et al., 2007). A gema do ovo começou a ser estudada na criopreservação de sêmen da espécie bovina (PHILLIPS e LARDY, 1940), apresentando resultados satisfatórios, quando comparados aos meios suplementados apenas com glicose, com aumento considerável da viabilidade espermática.

Segundo Holt (2000), a principal função protetora da gema de ovo é estabilizar as membranas biológicas, minimizando os efeitos negativos do choque térmico. Entretanto, o mecanismo de ação que confere tal proteção durante a criopreservação ainda não está totalmente elucidado, sendo levantadas várias hipóteses sobre a atuação da gema de ovo na célula espermática.

Watson (1976), avaliando o comportamento das células espermáticas criopreservadas de carneiros e bovinos, sugeriu que uma parte da gema de ovo, chamada de fração de baixa densidade (LDF), era responsável pela proteção dos espermatozoides destas espécies. Posteriormente, Watson (1981) concluiu que estes fosfolipídeos fornecem proteção à membrana da célula espermática, uma vez que a proteína da LDF serviria para solubilizar os lipídeos e incorporá-los à membrana celular. No entanto, Ricker et al. (2006), avaliando a criopreservação de sêmen equino, constataram que embora haja associação entre os lipídeos presentes nos diluidores, estes não foram integrados à membrana plasmática nesta espécie.

Segundo Farstad (2009), a utilização da gema de ovo na preparação de crioprotetores é questionada quanto à sua origem, que pode veicular possíveis micro-organismos, e não ao seu efeito protetor. Substitutos para este crioprotetor não penetrante vêm sendo testados, como lecitinas de soja (HIWASA et al., 2009), visando preparar meios quimicamente definidos, o que não seria possível com o uso da gema de ovo, imprecisa quanto a sua composição (HOUPALATHI et al., 2007).

Bittencourt et al. (2008) testaram também alternativas aos diluentes convencionais de sêmen. Na espécie caprina, os diluentes à base de lecitina de soja apresentaram resultados abaixo do esperado para aprovação do sêmen congelado. Da mesma forma, Aboagla e Terada (2004) observaram que a integridade do acrossoma de espermatozoides caprinos congelados com gema de ovo foi menor do que aqueles obtidos com outros diluentes.

Valente et al. (2010) avaliaram a substituição parcial ou total da gema de ovo no diluidor de sêmen ovino e observaram que a adição de trealose e glicina, associada à substituição da glicose pela frutose, não foi capaz de compensar a ausência da gema de ovo. Segundo estes autores, melhores resultados de motilidade, termorresistência, fertilidade *in vitro* e *in vivo* pós-descongelamento, foram obtidos após utilização da gema de ovo no meio diluidor.

Bergeron et al. (2007), criopreservando sêmen bovino com diluentes à base de gema de ovo ou leite, concluíram que, da mesma forma que a gema de ovo, as caseínas do leite reduzem a ligação das proteínas do plasma aos espermatozoides, minimizando a perda de lipídeos da membrana plasmática durante os procedimentos de criopreservação e aumentando a proteção espermática durante a refrigeração e a congelamento/descongelamento (Figura 2). Ao contrário da gema de ovo, o efeito protetor do leite sobre a célula espermática envolve proteínas ao invés de lipídeos (BERGERON et al., 2007).

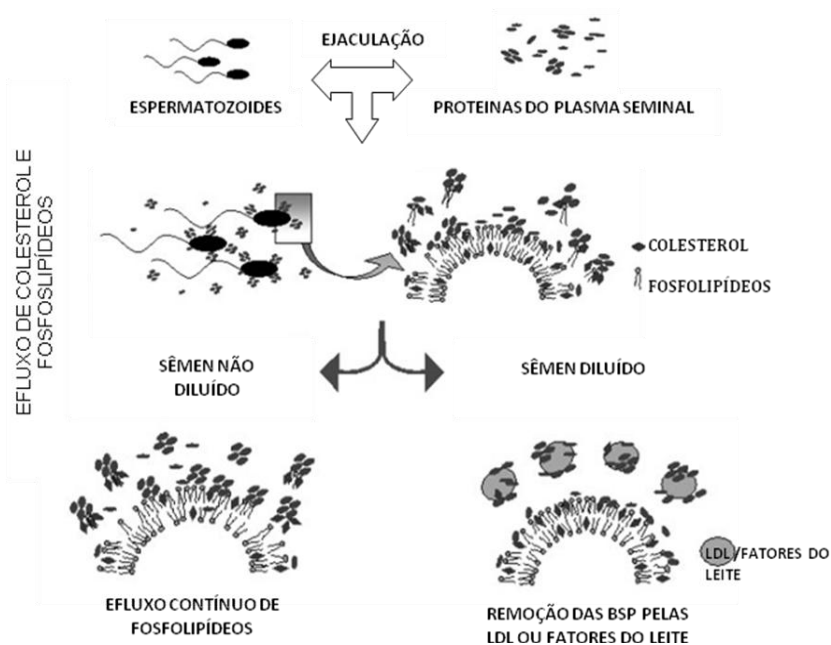


Figura 2. Mecanismo de proteção espermática conferida por diluidores à base de gema de ovo e leite desnatado. Fonte: adaptado de Bergeron e Manjunath (2006).

Segundo Purdy (2006), a escolha do açúcar a ser incluído no crioprotetor deve ser baseada na sua funcionalidade e propriedades químicas. Dentre os açúcares utilizados nos meios diluidores para criopreservação de sêmen estão os açúcares simples, como a frutose e a glicose, e os açúcares não penetrantes na célula, como

lactose, rafinose e trealose (SQUIRES et al., 2004). A ação dos açúcares não penetrantes consiste em elevar a pressão osmótica, resultando na desidratação celular, com conseqüente redução da formação de gelo intracelular. Além disso, os açúcares podem interagir com os fosfolipídeos da membrana plasmática, reorganizando-a e, a partir disto, aumentando a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação (BUCAK et al., 2007).

- Crioprotetores penetrantes

Os crioprotetores penetrantes são solutos que atuam tanto interna quanto externamente no espermatozoide, desidratando a célula espermática devido ao efluxo de água intracelular para equilibrar o meio extracelular. Esta categoria de crioprotetores penetra na membrana celular através de difusão passiva, permanecendo na membrana e citoplasma, uma vez que, semelhante aos agentes não penetrantes, atua na desidratação celular através do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico que induz a saída de água das células espermáticas (PURDY, 2006).

O Glicerol ou propano-1,2,3-triol é um composto orgânico pertencente à função álcool, apresenta-se líquido à temperatura ambiente (25 °C), higroscópico, inodoro, viscoso, sabor adocicado e massa molecular de 92 g/mol. O nome origina-se da palavra grega glykos (γλυκός), que significa doce. O termo Glicerina refere-se ao produto na forma comercial, com pureza acima de 95% (FERNANDES et al., 2002). Na década de 50, esta substância começou a ser utilizada na criopreservação de células e microorganismos. Além do efeito osmótico, o glicerol atua diretamente na membrana plasmática, havendo evidências de que se liga aos fosfolipídeos presentes na cabeça espermática, reduzindo a fluidez da membrana e interagindo com ligações proteicas e glicoproteicas da membrana (PARKS e GRAHAM, 1992).

Em solução contendo glicerol, no momento em que ocorrer a congelação, haverá mais água descongelada do que naquela que não contém glicerol, resultando no aumento do volume dos canais de solvente não congelado e na menor concentração de sais nesses canais (BAUDOT et al., 2002). Entretanto, segundo Alvarenga et al. (2000), o glicerol causa efeito tóxico à célula espermática, determinando desnaturação proteica; modificação nas interações de actina, que provavelmente interfere no deslizamento das fibras densas da cauda do espermatozoide; além de alterações no glicocálice e nas proteínas da superfície celular, que interferirá no reconhecimento dos receptores da zona pelúcida.

A adição do glicerol pode ser realizada de duas formas: no momento da diluição inicial, à temperatura ambiente, quando o crioprotetor está em concentração total no diluente utilizado, ou após a refrigeração do sêmen, na temperatura de 5 °C, visando reduzir os efeitos tóxicos do glicerol. Entretanto, com o uso de métodos automatizados de refrigeração e congelamento do sêmen (KUMAR et al., 2003), é impossível a adição do crioprotetor após a curva de refrigeração. Em consequência deste efeito tóxico, vários trabalhos vêm sendo realizados visando substituir o glicerol por outro crioprotetor que seja tão eficaz e menos nocivo à célula espermática.

2.5 Antioxidantes

Com o objetivo de melhorar os índices de fertilidade com a utilização do sêmen criopreservado, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para manter a integridade do espermatozoide durante as etapas de refrigeração e congelamento. Dentre tais pesquisas, evidencia-se a importância dos antioxidantes na proteção celular durante os procedimentos de manipulação espermática e redução da temperatura, com o intuito de reduzir as crioinjúrias ocasionadas pelo estresse oxidativo (GUERRA et al., 2004).

O termo antioxidante significa "impedir a oxidação de outras substâncias químicas". Os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, enzimas, pigmentos naturais e outros compostos vegetais que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres ou oxidantes (STEDMAN, 2003). Segundo Halliwell (2000), a função destes antioxidantes, quando presentes em baixa concentração quando comparado à do substrato oxidável, é regenerar o substrato ou prevenir significativamente a oxidação do mesmo. A célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas, uma como detoxificadora do agente oxirredutor antes que este cause a lesão celular, constituída por glutathione reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico (vitamina C), glutathione-redutase (GSH-Rd) e GSH-Px, entre outros. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes situa-se no meio intracelular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Diferente da maioria das células, o espermatozoide perde a maior parte de seu citoplasma durante o período de maturação, sendo desta forma privado de uma fração

dos antioxidantes endógenos, tornando-o vulnerável à ação das ROS (CARVALHO et al., 2002). Consequentemente, os espermatozoides ejaculados dependem da proteção dos antioxidantes presentes no plasma seminal, que se torna a forma de proteção mais importante utilizada pelos espermatozoides contra as ROS (SIKKA, 2004), tanto que a concentração de antioxidantes no mesmo é maior do que em outros líquidos biológicos (TAYLOR, 2001).

Com a prévia diluição do sêmen para os processos de criopreservação, a concentração de antioxidantes diminui, ocasionando desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, tendo como consequência o estresse celular (BILODEAU et al., 2000). Segundo Sarlós et al. (2002), a concentração de enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT diminui bastante quando o sêmen é diluído. Para a resolução deste possível desequilíbrio, a adição de antioxidantes aos diluidores de preparação, manutenção e criopreservação (MORTIMER, 2000a) passou a ser estudado em diferentes espécies e processos de criopreservação.

2.5.1 Catalase

A Catalase (CAT) é uma enzima intracelular, encontrada na maioria dos organismos nos peroxissomas, que são organelas esféricas, envolvidas por uma membrana vesicular presente no citoplasma, sobretudo em células animais. São as organelas responsáveis pelo armazenamento das enzimas diretamente relacionadas com o metabolismo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), substância altamente tóxica para a célula, uma vez que é o principal precursor da formação de radicais OH^- (ORTEGA et al., 2003). A Catalase pertence à subclasse das enzimas oxidorredutases, que usam o peróxido como receptor e doador de elétrons (BARREIROS et al., 2006). Esta peroxidase decompõe o H_2O_2 segundo a reação química:



Ball et al. (2000) identificaram a presença da CAT no plasma seminal, na fração oriunda principalmente da glândula prostática, e afirmaram que práticas como a

remoção do plasma seminal podem diminuir consideravelmente a atividade da enzima (remoção do peróxido de hidrogênio), expondo a célula espermática a estresse oxidativo. Kankofer et al. (2005) avaliaram a atividade da CAT no sêmen refrigerado de equinos e observaram que esta enzima reduz a lipoperoxidação das células espermáticas submetidas à temperatura de 5 °C, por um período de 24 horas. Em touros, Bilodeau et al. (2000) detectaram ausência de CAT na célula espermática, sendo sua presença identificada apenas no plasma seminal.

Pasqualotto et al. (2006) realizaram estudos em humanos férteis e inférteis e identificaram concentração reduzida da atividade de CAT em doadores inférteis, quando comparados àqueles sem problemas de fertilidade. Em humanos sem histórico de infecção ou alterações no sistema circulatório que possam interferir na reprodução (varicocele), a atividade da CAT foi diminuída em decorrência de hábitos como fumo, que contém substâncias que atuam diretamente no sistema antioxidante. Esta observação foi comprovada quando a prática do fumo foi interrompida e as concentrações de CAT e outros antioxidantes voltaram aos valores normais na célula espermática e no plasma seminal (ELSHAL et al., 2009).

Kawakami et al. (2007) avaliaram cães com parâmetros reprodutivos normais e cães com astenozoospermia e identificaram que nestes últimos, a CAT apresentava atividade reduzida. Após identificação dos cães com alteração na qualidade espermática, adicionaram 100 U/mL desta enzima ao diluente de manutenção dos espermatozoides destes animais, comprovadamente com baixa atividade da CAT, e observaram melhoria nos parâmetros seminais após a incubação por três horas. Estes achados permitiram concluir que a adição deste antioxidante pode melhorar os índices de motilidade em indivíduos com problemas de fertilidade (KAWAKAMI et al., 2007).

Como observado anteriormente, a prévia diluição do sêmen e sua exposição a baixas temperaturas favorece a formação de ROS em decorrência do estresse oxidativo ao qual a célula espermática foi exposta. Maxwell e Stojanov (1996) adicionaram CAT ao crioprotetor de refrigeração do sêmen ovino em quatro diferentes concentrações (100, 200, 400 e 800 U/mL) e observaram que concentrações acima de 200 U/mL foram tóxicas para o espermatozoide ovino. Entretanto, como não avaliaram o índice de lipoperoxidação, não conseguiram determinar o mecanismo que determinou tal efeito tóxico.

De Graaf et al. (2007) adicionaram 100 U/mL de CAT na preparação do sêmen ovino para a sexagem espermática e congelação. A hipótese testada é que a enzima

agiria minimizando a lipoperoxidação, uma vez que o procedimento utilizado para a seleção de espermatozoides sexados ocasiona várias lesões, como a fragmentação do DNA, capacitação espermática prematura e interferência nos parâmetros de velocidade. Entretanto, não foram identificadas alterações na motilidade após descongelação e incubação por seis horas em relação ao grupo controle. Interessante ressaltar que os valores observados no grupo controle deste experimento foram considerados de boa qualidade. Neste caso, provavelmente, a atividade da CAT não foi requerida.

Relevante ainda são os achados de Upreti et al. (1997), que utilizaram diferentes antioxidantes na refrigeração (15 °C/ 24 horas) de sêmen de carneiros, entre eles a CAT (45 µg/mL), onde não observaram interferência destas substâncias na melhora da viabilidade espermática, sugerindo que o diluente quimicamente definido utilizado para a criopreservação do sêmen pudesse conter atividade antioxidante. Em outro experimento, Upreti et al. (1998) detectaram a presença da enzima aromática Aminoácido Oxidase no sêmen de carneiros, com alto nível de atividade em comparação ao sêmen bovino. Esta enzima aumenta sua atividade na presença do piruvato, encontrado na composição do diluente quimicamente definido utilizado por estes autores, que justificaram, desta forma, que a adição de CAT não teve o efeito esperado por não haver produção do oxidante no qual a CAT atua.

O espermatozoide da espécie suína é reconhecidamente mais frágil aos processos de refrigeração a 5 °C (KATZER et al., 2005) e congelamento (OHATA et al., 2001). Roca et al. (2005) testaram a adição de 200 e 400 U/mL de CAT ao diluente de congelamento do sêmen de suínos e observaram que em ambas as concentrações houve aumento na capacidade dos espermatozoides produzirem embriões *in vitro*, identificando menor produção de ROS nos grupos tratados com a enzima.

Assim, os trabalhos com a adição de CAT ao diluente de criopreservação de sêmen, principalmente na espécie ovina, evidenciaram a necessidade de estudos que determinem concentrações ideais para a utilização deste antioxidante, visando melhorar os resultados de fertilidade após IA com o sêmen pós-descongelamento.

2.5.2 Glutationa

A Glutationa (γ -glutamilcisteinilglicina) é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos. Trata-se de um tripeptídeo linear, constituído por três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo o grupo tiol da cisteína o local ativo responsável pelas suas propriedades

bioquímicas. A GSH é a forma reduzida da glutathiona, sendo o grupo sulfidríla (SH) o responsável pela proteção da célula contra o estresse oxidativo (LUBERDA, 2005).

A GSH está presente na maioria das células em concentrações de 1 a 8 mM, geralmente, em sua maior quantidade no fígado. Na região extracelular, a concentração de glutathiona é da ordem de 5-50 mM (ROVER JÚNIOR et al., 2001). Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG), que é a forma dimerizada da GSH. A importância deste par é tal, que a razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado redox (espontaneidade ou tendência química para adquirir elétrons e, desse modo, ser reduzido) dos sistemas biológicos. Em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fração (menos de 10%) da glutathiona total (IRVINE, 1996).

A distribuição da glutathiona no sistema reprodutor masculino é diferenciada de acordo com a espécie estudada. Geralmente a maior concentração de glutathiona está na célula espermática, com pouca quantidade no plasma seminal. Entretanto, há espécies que tem esta proporção inversa (Tabela 1). Segundo Raijmakers et al. (2003), a concentração da glutathiona no plasma seminal é determinante para a fertilidade, uma vez que a diminuição das concentrações deste tiol está associada à subfertilidade ou mesmo à infertilidade masculina.

Tabela 1. Concentrações de Glutathiona no espermatozoide e plasma seminal de diferentes espécies de mamíferos

Espécie	Espermatozoide	Referência	Plasma Seminal	Referências
Humana	6,2±0,6 nmol/10 ⁸ sptz	Griveau et al. (1995)	0,19±0,11 µM	Daunter et al. (1989)
Suína	0,03 nmol/10 ⁸ sptz	Li (1975)	185,8±46,7 µM	Strzezek et al. (2002)
Bovina	566±72 pmol/mg protein	Bilodeau et al. (2000)	17±7 pmol/mg protein	Bilodeau et al. (2000)
Canina	0,53±0,11 nmol/10 ⁸	Li (1975)	-	-
Ovina	0,45±0,14 nmol/10 ⁸	-	-	-
Eqüina	-	-	77,27±48,0 mg/100 cm ³	Strzezek et al. (2002)
Cunícula	0,01 nmol/10 ⁸	Li (1975)	-	-
Cricetídea	30-40 nmol/mg protein	Den Boer et al. (1989)	-	-
<i>M. musculus</i>	90 nmol/10 ⁸	Alvarez e Storey (1989)	-	-

Fonte: adaptado de Luberda (2005).

O metabolismo da glutathiona ocorre da seguinte forma (Figura 3): duas moléculas de GSH, pela ação da GPx, atuam sobre o peróxido de hidrogênio, reduzindo-o em duas moléculas de água e uma de GSSG. Por sua vez, esta molécula de GSSG, juntamente com uma molécula de hidrogênio e presença de Nicotinamida

adenina dinucleotídeo fosfatada (NADPH), sob ação da glutatona redutase (GRd), é convertida a duas moléculas de GSH e NADP. Na verdade, tanto a GSH quanto a GSSG são substratos para a atividade enzimática antioxidante das GPx e GRd (CHRISTOPHERSEN, 1968).

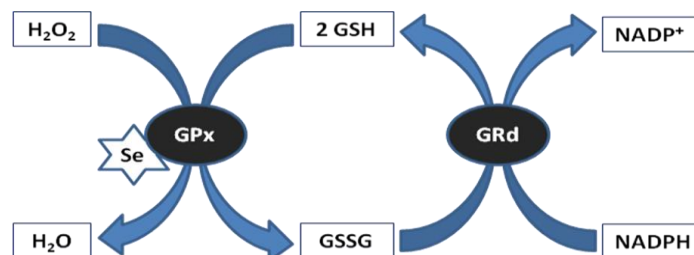


Figura 3. Ciclo redox da Glutatona. Fonte: adaptado de Bilodeau et al. (2001).

Sabe-se ainda que as concentrações das glutatonas enzimáticas expressam-se em grandes quantidades tanto no plasma seminal quanto na célula espermática. Marti et al. (2008) quantificaram as enzimas presentes em ejaculados de carneiros submetidos a criopreservação, evidenciando que as GPx e GRd estão em quantidade e atividade elevada, mesmo em ejaculados que foram submetidos à criopreservação, em comparação ao sêmen *in natura*. Em contrapartida, Bilodeau et al. (2000) identificaram redução de até 78% nas concentrações de GSH no sêmen bovino pós-congelação. Com a diminuição da quantidade do substrato GSH, não há como reduzir os oxidantes formados, independente das concentrações das enzimas GPx e GRd. Assim, é interessante a adição de GSH ao diluente de criopreservação de células espermáticas.

Bilodeau et al. (2001) testaram a adição de GSH, GSSG e GPx ao diluente de congelação de sêmen bovino, concluindo que a adição apenas da GSSG não conseguiu regenerar eficientemente a GSH, assim como concentrações micromolares (μM) da GSH não foram eficientes na preservação do espermatozoide bovino. Estes autores sugerem que a adição da GSH seja realizada em concentração milimolares (mM) e da GPx em pequenas quantidades (5 U/mL). Sinha et al. (1996) testaram a adição de GSH na criopreservação de sêmen caprino, nas concentrações de 2 e 5 mM e identificaram resultados satisfatórios na taxa de fertilização com a adição de 5mM da GSH, em comparação ao grupo controle. Soares et al. (2009) testaram a adição de 2, 5 e 7 mM de GSH na criopreservação de sêmen caprino e, diferente dos resultados obtidos por Sinha et al. (1996), observaram que a melhor concentração de GSH foi a de 2 mM. Entretanto,

em ambos os trabalhos, os resultados foram numericamente superiores, sem apresentar diferenças estatísticas.

Câmara et al. (2009) testaram a adição de diferentes concentrações de GSH (0,5; 1,0 e 2,0 mM) na criopreservação do sêmen de carneiros e observaram que a medida que aumentava a quantidade de GSH adicionada, aumentava a capacidade antioxidante total. Entretanto, não foi evidenciada melhora na cinética espermática em relação ao grupo que não recebeu a adição de antioxidantes. Estes autores ainda ressaltaram que provavelmente estes efeitos não foram obtidos mediante as propriedades da gema de ovo, que têm atividade antioxidante difícil de ser estimada, por não se conhecer os componentes totais deste suplemento.

Foote et al. (2002) testaram diferentes concentrações de GSH (0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mM) na refrigeração de sêmen de touros e identificaram que o diluente utilizado interfere na capacidade de proteção do substrato adicionado, que, neste caso, foi o leite, ou melhor, as micelas de caseína também foram eficazes na proteção celular. Desta forma, a adição da GSH tem sido estudada e apontada como um interessante recurso na redução do estresse oxidativo que a célula espermática pode sofrer, sendo necessárias mais pesquisas sobre as concentrações ideais deste substrato antioxidante, assim como a interação deste com diferentes crioprotetores.

2.5.3 Superóxido dismutase

A Superóxido dismutase (SOD) é uma enzima que catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e H_2O_2 (NISHIKIMI e MACHLIN, 1975). Devido a esta função, participa de um importante sistema antioxidante nas células expostas ao oxigênio (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). Segundo Barreiros et al. (2006), existem várias formas comuns de SOD, que são proteínas com cofatores minerais como o cobre, zinco, manganês, ferro ou níquel.

Nos organismos vivos há três formas de SOD: a SOD1, encontrada no citoplasma; SOD2, nas mitocôndrias e SOD3, no líquido extracelular. A primeira é um dímero (consiste em duas subunidades), enquanto que as outras são tetrameros (quatro subunidades). As SOD1 e SOD3 contêm cobre e zinco, enquanto que SOD2 tem manganês no seu centro reativo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Em experiências laboratoriais, animais com deficiência de SOD1 (ELCHURI et al., 2005) e SOD2 (LI et al., 1995) apresentam severas patologias que são incompatíveis com a vida, enquanto que na deficiência da SOD3 os animais apresentam atividades biológicas normais.

Desta forma, as apresentações SOD1 e SOD2 são essências para a vida dos animais (MULLER et al., 2006).

Na reprodução, a enzima SOD tanto foi encontrada na célula espermática quanto no plasma seminal de diferentes espécies mamíferas e tem a função de prevenir a peroxidação lipídica no espermatozoide (STOREY, 1997). Kankofer et al. (2005) estudaram a atividade da enzima SOD no sêmen refrigerado de equinos a 5 °C e identificaram que a ação da SOD foi diminuída no sêmen diluído, quando em comparação ao sêmen mantido com o plasma seminal. Segundo Pasqualotto et al. (2006), redução nas concentrações de SOD estão relacionados à presença de células espermáticas danificadas e, conseqüentemente, está associada à infertilidade humana. Na criopreservação, Bilodeau et al. (2000) identificaram a redução de até 50% na atividade da SOD após a criopreservação do sêmen de bovinos. Como a manipulação do sêmen para posterior criopreservação expõe a célula espermática ao oxigênio e radiação de luz, a formação de ROS é favorecida, necessitando da ação do sistema antioxidante e diminuindo as concentrações desta enzima (BILODEAU et al., 2001).

Assim, a adição da SOD, em associação ao cobre e zinco, tem sido testada em diluentes de criopreservação. Stefanov et al. (2004) adicionaram três diferentes concentrações de SOD (30, 60 e 120 U/mL) na incubação de sêmen ovino por cinco horas, a 39 °C, e observaram que as maiores doses de SOD foram mais eficazes, enquanto que a dosagem mais baixa não teve efeito ou, se apresentou, foi temporário. Estes autores afirmaram que a administração exógena de SOD suprimiu a formação de H₂O₂. Maxwell e Stojanov (1996) adicionaram 100, 200, 400 e 800 U/mL de SOD ao diluente de refrigeração de sêmen ovino e avaliaram a incubação nas temperaturas de 25 e 5 °C, por 12 dias, identificando que todas as concentrações de SOD foram benéficas para a preservação espermática nas duas temperaturas de armazenamento. Entretanto, este efeito foi observado até o sexto dia de incubação, sendo ineficaz no período restante de incubação.

Foote et al. (2002) trabalharam com a adição de SOD nas concentrações de 100 e 250 U/mL, associados à dosagens de GSH, na congelação de amostras de sêmen bovino e não observaram diferenças significativas quando utilizaram o sêmen de touros na IA, em relação ao grupo controle. Desta forma, são necessárias pesquisas que estudem a adição de SOD em determinadas concentrações ao diluente de criopreservação, visando reduzir a ocorrência de injúrias causadas pela congelação/descongelação.

2.5.4 Vitamina E

A nomenclatura vitamina foi criada pelo bioquímico Polonês Casimir Funk (1884-1967), no ano de 1912, baseada na palavra latina *vita* (vida) e no sufixo *amina* (aminas vitais ou aminas da vida), sendo usada inicialmente para descrever substâncias do grupo funcional amina, em virtude de se acreditar que todas as vitaminas eram aminas. Inicialmente à descoberta, as vitaminas não podiam ser classificadas cientificamente, recebendo anteriormente letras para determinar diferenças específicas entre elas, como local de armazenamento, por exemplo (FELTRE, 2005).

As vitaminas foram classificadas de acordo com a solubilidade, sendo lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K) e hidrossolúveis (vitaminas presentes no complexo B e vitamina C) (FELTRE, 2005). Com o avanço dos estudos, criou-se a denominação de vitamina E para um grupo vitamínico que engloba oito substâncias diferentes do grupo dos tocoferóis e dos tocotrienóis, dos quais os tocoferóis possuem quatro moléculas (α , β , γ e δ) com capacidade antioxidante (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Segundo Kagan et al. (1990), a vitamina E atua na proteção das lipoproteínas de baixa densidade presentes na membrana plasmática, sendo a oxidação desta fração lipídica suprimida até a depleção total desta vitamina e de seus análogos. Entretanto, Kagan et al. (1992) sugerem que a vitamina E não atua exclusivamente sobre os lipídeos, agindo também sobre as proteínas presentes na membrana, conferindo proteção estrutural à membrana plasmática da ação dos oxidantes. Considerando a localização do α -tocoferol nas membranas subcelulares, acredita-se que esta vitamina remova principalmente o ânion superóxido, gerado por enzimas ligadoras de membrana que participam na oxidação biológica (NISHIKIMI e MACHLIN, 1975).

A adição da vitamina E na alimentação de humanos e animais tem sido realizada com diversificados objetivos, principalmente melhorar os índices reprodutivos e avaliada como positiva. Nos experimentos com a vitamina E na alimentação, Yousef et al. (2003) trabalharam com coelhos, adicionando 1,0 g/L na água de beber dos animais e identificaram que a ingestão desta vitamina reduziu a produção de radicais livres e melhorou significativamente a qualidade seminal nesta espécie. Audet et al. (2004) adicionaram a vitamina E (480 UI) na alimentação de suínos e observaram que o grupo suplementado obteve melhor qualidade espermática do que aqueles não suplementados durante sistema intensivo de colheita de sêmen. Yue et al. (2010) testaram diferentes

concentrações de vitamina E (20, 200, 1000 e 2400 UI) na alimentação de carneiros durante o período de 12 meses e observaram que a dosagem de 200 UI melhorou a qualidade seminal, inclusive com aumento das enzimas do sistema antioxidante (SOD e GPx).

Jain et al. (2000) testaram a suplementação de 100 UI de vitamina E por dia na alimentação de humanos e observaram diminuição da peroxidação lipídica em eritrócitos e aumento das concentrações de glutathione. Este estudo foi direcionado para pacientes com diabetes, mas pode indicar também resultados efetivos na reprodução, visto que a glutathione é substrato para o complexo redox glutathione, com finalidade de reduzir as concentrações de H_2O_2 (KNAPEN et al., 1999), assim como favorecer a proteção da célula espermática pela redução da peroxidação lipídica (CHRISTOVA et al., 2004).

Mediante as funções e resultados comprovadamente benéficos da vitamina E na suplementação alimentar, é despertado o interesse de adicionar tal composto ao diluente de criopreservação de espermatozoides. Entretanto, a natureza lipídica deste antioxidante dificultava sua dissolução em meios aquosos comumente utilizados. Assim, o ácido carboxílico 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- foi desenvolvido e classificado como permeante celular, hidrossolúvel, com propriedades antioxidantes, comercialmente conhecido como Trolox[®] (SCOTT et al., 1974). Ao ser testado, foi observado que o Trolox pode ser utilizado como um ágil transferidor de elétrons em reações, inclusive na transferência do hidrogênio, resultando em um radical fenoxil relativamente estável, similar à função da vitamina E (DAVIES et al., 1988). Bergmann et al. (1997) avaliaram a substituição do α -tocoferol pelo Trolox[®] na preservação das lipoproteínas de baixa densidade e identificaram que o análogo da vitamina E desempenha efetivamente a atividade de aumentar o tempo de latência para a degradação das lipoproteínas de baixa densidade, tornando-se uma alternativa eficiente contra a peroxidação lipídica.

Almeida e Ball (2005) incubaram sêmen equino na temperatura de 38 °C, por 120 minutos em diferentes concentrações (5, 25, 100 e 500 μ M) de α -tocoferol e α -tocoferol succinato, e observaram que o succinato foi mais eficaz na prevenção da peroxidação lipídica. Entretanto, esta substância antioxidante suprimiu a motilidade espermática. Os autores apontaram que o succinato pode ter sido desestirificado, formando o ânion succinato, que, provavelmente, reagiu com outras ROS, diminuindo o percentual de células móveis. Assim, a utilização de produtos mais purificados da

vitamina E pode influenciar positivamente os resultados de preservação de sêmen em diferentes espécies. Resultados similares foram obtidos por Donnelly et al. (1999), que, ao adicionarem a vitamina E em amostras de sêmen humano, isolada ou concomitante à vitamina C, obtiveram redução da produção de oxidantes, porém não se constatou melhora na cinética espermática.

Upreti et al. (1997) utilizaram a vitamina E, diluída em etanol, na dosagem de 10 mM para a criopreservação de sêmen de carneiros a 15 °C, por 24 horas, e observaram que a adição da vitamina interferiu negativamente sobre a motilidade espermática. Estes resultados foram igualmente observados por Sarlós et al. (2002), que testaram diferentes concentrações da vitamina E (0,5, 1,0, 2,5, 5,0 mg/mL) na refrigeração de sêmen de carneiros por um período de nove dias e classificaram a α -tocoferol acetato como um fraco protetor contra a formação de ROS. Vale ressaltar que as concentrações utilizadas da vitamina E, assim como a composição lipídica da membrana espermática de carneiros, pode ter determinado resultado diferenciado em comparação a outras espécies. Dalvit et al. (1998) testaram a adição de 1 mg/mL de α -tocoferol ao meio de fertilização *in vitro* de oócitos bovinos e afirmaram que concentrações reduzidas de vitamina E permitem que as ROS atuem na desestabilização das membranas, etapas fisiológicas para a fertilização. Em contrapartida, doses elevadas desta vitamina afetam a fluidez da membrana espermática, alterando o processo de capacitação espermática.

Peña et al. (2003) utilizaram o Trolox[®] (100 e 200 μ M) na congelação do sêmen de suínos e identificaram que a maior dosagem conferiu melhores resultados para a motilidade espermática e potencial de membrana mitocondrial. Breininger et al. (2005), também utilizando a espécie suína e adicionando diferentes concentrações de acetato de α -tocoferol (100, 200 e 500 μ g/mL), evidenciaram que a dosagem de 200 μ g/mL preservou a integridade mitocondrial, melhorando, desta forma, os índices de motilidade, uma vez que a célula espermática preservou a matriz de energia.

Na criopreservação de sêmen equino, Silva et al. (2008) testaram a dosagem de 120 mM de Trolox[®] ao meio de refrigeração e obtiveram resultados satisfatórios quanto à motilidade, decidindo testar esta mesma concentração na congelação do sêmen desta espécie. Entretanto, os resultados não foram favoráveis aos parâmetros avaliados. Silva et al. (2009b) testaram a mesma dosagem de 120 mM após a descongelação do sêmen de equinos e obtiveram resultados significativos na motilidade espermática após 120 minutos de incubação a 37 °C.

Estes estudos evidenciam a importância do estabelecimento de protocolos utilizando a vitamina E na criopreservação do sêmen das mais variadas espécies. Os resultados podem ser mais expressivos na refrigeração do sêmen, na congelação ou ainda na pós-descongelação, assim como estabelecer a concentração ideal para a adição, salvaguardando as diferentes composições de membrana plasmática de cada espécie.

2.6 Avaliação espermática

Mocé e Graham (2008) relataram que a avaliação do sêmen, utilizando testes laboratoriais é extremamente importante para a indústria da inseminação artificial, com a finalidade de fornecer produtos de qualidade para os clientes e, conseqüentemente, maximizar a utilização das técnicas. Os autores reforçam que utilizando diferentes ensaios para a avaliação espermática, torna-se possível determinar a capacidade fertilizante de espermatozoides de uma amostra de sêmen, da mesma forma que possibilita identificar e condenar amostras de sêmen de má qualidade.

Sabe-se, porém, que nenhum teste isolado é capaz de medir a fertilidade de um ejaculado (ARRUDA et al., 2007), necessitando-se avaliar vários parâmetros para determinar uma maior ou menor fertilidade potencial do macho (SIQUEIRA et al., 2007). Segundo Mies Filho (1982), duas classes de caracteres devem ser levadas em consideração na avaliação espermática, além do exame microbiológico: os caracteres físico/químicos e os microscópicos. No primeiro, avaliações para determinar volume, cor, aspecto, odor e pH podem ser realizadas. No segundo, podem ser mensurados parâmetros para concentração, motilidade, vigor, proporção de espermatozoides vivos e morfologia espermática.

Saacke (1982) determinou que as bases gerais para a mensuração da viabilidade espermática devem estar vinculadas a avaliações de: motilidade, velocidade, penetração do muco cervical, preservação do conteúdo celular (núcleo, enzimas e lipídeos), integridade estrutural da membrana plasmática e acrossoma, habilidade para aglutinação em presença de soro sanguíneo (cabeça a cabeça) e habilidade em passar através de filtros como lã de vidro e membrana Sephadex. Nos parâmetros microscópicos, a motilidade espermática é uma estimativa subjetiva de grande importância na avaliação seminal. Este exame avalia o porcentual (0-100%) de células que apresentam movimento, conseqüentemente, de células vivas em uma determinada amostra de sêmen, assim como informa a qualidade do movimento (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Segundo Salviano e Souza (2008), os movimentos dos espermatozoides não obedecem a um padrão único, pois há deslocamentos para frente (movimento progressivo), em circunferência (movimento circular) ou, ainda, se limitam a oscilar no campo microscópico (movimento oscilatório ou local). Desta forma, o CBRA (1998) estabeleceu que: quando o porcentual de espermatozoides móveis é superior aos de gametas com motilidade progressiva, este parâmetro deve ser expresso separadamente, como motilidade total e progressiva.

Segundo Kumar (2000), a motilidade progressiva é de grande importância para a viabilidade espermática após o processo de criopreservação, sendo este o parâmetro mais importante para a fertilização. Entretanto, outros autores não correlacionam a motilidade espermática com a fertilidade. Siqueira et al. (2007) avaliaram a correlação da motilidade progressiva com a taxa de prenhez em fêmeas bovinas e constataram que não houve interferência ou correlação entre os dois parâmetros.

Estes mesmos estudos foram desenvolvidos por Borges Júnior et al. (2003), onde relatam que não houve relação da motilidade progressiva com a taxa de gestação em mulheres inseminadas intrauterinamente, sendo a concentração espermática mais importante nos resultados de fertilização do que o movimento espermático. Xu et al. (1998) avaliaram os parâmetros seminais de motilidade, concentração e morfologia na inseminação de fêmeas suínas, observando que a motilidade não foi significativa para determinar o aumento na taxa de prenhez, enquanto que concentrações espermáticas baixas diminuíram o tamanho da leitegada, assim como a qualidade morfológica dos espermatozoides conferiu maior fertilidade. Entretanto, a avaliação subjetiva da motilidade espermática pode determinar variações de acordo com a experiência do avaliador (VERSTEGEN et al., 2002).

Diante da necessidade de estabelecer padrões para a utilização do parâmetro de motilidade, reduzindo a subjetividade na avaliação, sistemas automáticos de análise seminal (CASA) foram desenvolvidos, fornecendo maior confiabilidade e velocidade na obtenção de dados (MATOS et al., 2008). O sistema CASA foi desenvolvido em meados dos anos 1980 e foi proposto como um equipamento que poderia substituir o andrologista no laboratório diante da sua velocidade em fornecer parâmetros como concentração e morfologia espermáticas, técnicas que geralmente dispendem tempo na execução (MORTIMER, 2000b).

Segundo Katz e Davis (1987), o diferencial do sistema CASA é a capacidade de produzir informações sobre a cinética espermática, com a utilização de campos de vídeo

contendo imagens de espermatozoides eletronicamente digitalizados, bem como a determinação da posição central de cada cabeça espermática. Os parâmetros fornecidos por este equipamento são: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e índice de oscilação ou wobble (WOB), expressos em porcentual; velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP), expressos em $\mu\text{m/s}$; frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), expresso em Hertz; amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH), expresso em micrômetros (MORTIMER, 1990; VERSTEGEN et al., 2002).

Desde o início da utilização desta técnica, vários questionamentos vêm sendo realizados, como os diferentes equipamentos disponíveis, as calibrações, as informações oferecidas pelos operadores ao sistema e a qualificação técnica destes operadores (VERSTEGEN et al., 2002). O primeiro entrave para a maximização do uso desta técnica é o custo inicial para aquisição do equipamento, geralmente adquirido por clínicas especializadas particulares ou instituições de pesquisa na sua maioria (AMANN e KATZ, 2004). As diferenças estruturais da célula espermática entre as espécies estudadas (PESCH e BERGMANN, 2006) é outro fator que determina limitações na expansão do sistema CASA, uma vez que se faz necessário fornecer ao programa informações específicas de cada célula espermática, como tamanho celular, por exemplo, para a eficácia dos resultados (MATOS et al., 2008).

Um ponto positivo é a crescente quantidade de publicações utilizando o sistema de avaliação CASA na área veterinária, desde o ano de 1987 até a atualidade (VERSTEGEN et al., 2002), trazendo informações sobre a cinética espermática em diversas espécies, o que gera interesse em aprofundar os estudos sobre a fisiologia do espermatozoide, sabendo ainda que cada indivíduo pode apresentar diferentes comportamentos cinéticos, assim como ejaculados de um mesmo indivíduo, visto que o ejaculado constitui a soma de subpopulações espermáticas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2007).

Os parâmetros VCL, VSL e VAP (Figura 4) definem quantitativamente o movimento dos espermatozoides, enquanto que os de LIN, STR, WOB, ALH e BCF definem a qualidade da cinética espermática (Tabela 2). Larsen et al. (2000) utilizaram o sistema CASA com o objetivo de prever o potencial de fertilidade de espermatozoides humanos e destacaram a importância dos valores de VCL, VAP, STR e BCF como preditivos para a fertilidade. Segundo MORTIMER (2000b), a VCL

refere-se à distância total que a célula espermática percorre em um determinado período de observação e é sempre a maior das três velocidades. A VSL é a distância determinada em linha reta do primeiro ao último ponto de observação, sendo geralmente a menor das três velocidades. A VAP é a distância média que o espermatozoide percorreu no período de observação. Nos casos em que a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear, com pouco movimento lateral de cabeça, a VAP tem valor semelhante à VSL. Em contrapartida, em trajetórias irregulares, não lineares ou que haja alto grau de desvio lateral da cabeça do espermatozoide, a VAP será muito maior em relação à VSL (MORTIMER, 2000b).

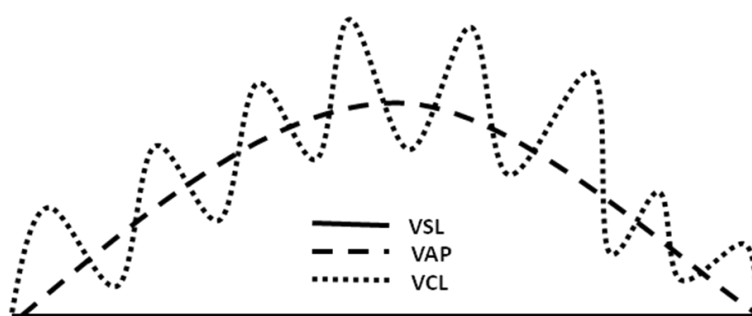


Figura 4. Representação gráfica dos parâmetros quantitativos expressos pelo sistema CASA em uma trajetória irregular. Adaptado de MORTIMER (2000b).

Tabela 2. Descrição dos parâmetros de velocidade qualitativa

Parâmetros	Proporções das três velocidades
Linearidade (LIN)	$(VSL/VCL) \times 100$
Retilinearidade (STR)	$(VSL/VAP) \times 100$
Índice de oscilação (WOB)	$(VAP/VCL) \times 100$

Fonte: adaptado de Mortimer (2000b).

Para o estudo da cinética de sêmen ovino, Cavalcante et al. (2008) avaliaram amostras de sêmen *in natura*, obtidas de animais criados nas condições climáticas do Nordeste brasileiro, sendo estes valores expressos na Tabela 3. Segundo estes autores, o primeiro quartil deve ser o valor mínimo para aprovação do ejaculado e o terceiro quartil deve ser o valor máximo para cada parâmetro avaliado. Na estatística descritiva, um quartil é qualquer um dos três valores que divide o conjunto ordenado de dados em quatro partes iguais, e, assim, cada parte representa 1/4 da amostra ou população. Os resultados obtidos por estes autores demonstraram que o sêmen ovino, na condição *in*

natura, apresenta características de movimento curvilinear, com VAP superior ao VSL e menor LIN em relação ao STR.

Tabela 3. Média, desvio padrão (d.p), coeficiente de variação (CV), 1º e 3º quartis dos parâmetros cinéticos para sêmen *in natura* de ovinos Santa Inês avaliados em sistema CASA

Parâmetros	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Média	141,7	97,8	120,3	67,3	79,4	83,0	3,5	7,8
d.p.	43,9	49,3	45,9	23,8	21,0	13,7	1,4	3,0
CV (%)	31,0	50,4	38,2	35,4	26,4	16,5	40,0	39,0
1º quartil	116,7	57,4	91,4	49,7	68,2	76,0	2,6	6,0
3º quartil	172,5	135,0	152,7	88,1	95,9	93,8	4,3	10,0

Fonte: Cavalcante et al. (2008).

Sabe-se, entretanto, que a criopreservação pode ocasionar alterações na célula espermática, que vão interferir na movimentação do espermatozoide. Mortimer e Maxwell (2004) testaram diferentes diluentes para determinar se a sua composição influenciava na cinética espermática e observaram que o espermatozoide ovino pós-criopreservação não apresenta movimentos clássicos como em outras espécies, citando que embora as células espermáticas tenham movimentos vigorosos de cauda e menor linearidade, não estavam hiperativadas, quando avaliadas com a sonda fluorescente Clortetraciclina (CTC).

Segundo Mortimer et al. (1998), em amostras de sêmen humano valores de VCL $\geq 150 \mu\text{m/s}$, linearidade $\geq 50\%$ e ALH $\geq 7,0$ definem o comportamento cinético compatível com hiperativação espermática. Gillan et al. (2008) avaliaram sêmen bovino pós-descongelamento e determinaram os valores de VCL $\geq 155 \mu\text{m/s}$, VSL $\geq 100 \mu\text{m/s}$, LIN $\geq 65\%$ e ALH $\geq 5,5 \mu\text{m}$ para caracterizar o espermatozoide bovino hiperativado. Neste caso, estes valores seriam indesejados no momento da avaliação do sêmen pós-descongelamento, uma vez que a hiperativação deverá ocorrer próximo ao local da fertilização e sua ativação precoce determina menor vida útil à célula espermática, conseqüentemente, reduzindo a capacidade fertilizante das amostras pós-criopreservação que obtiverem tal avaliação. Entretanto, Chan et al. (1998) observaram que pequenas variações na temperatura (40 °C) do banho-maria no momento da descongelamento podem hiperativar a célula espermática, não sendo consequência da

congelamento, mas do momento da descongelamento. Desta forma, torna-se primordial reduzir as variações para que resultados confiáveis sejam alcançados na avaliação *in vitro*.

Estes resultados demonstram que pesquisas são necessárias para determinar diferenças da cinética espermática entre as espécies e suas modificações em decorrência da criopreservação, assim como no momento da fertilização, não sendo pertinente estabelecer padrões de movimento espermático para uma determinada espécie baseado em outras espécies.

2.6.1 Integridade de membranas espermáticas

Como citado anteriormente, o espermatozoide é uma composição de diferentes estruturas que são necessárias para seu perfeito funcionamento. Sabe-se que a célula espermática pode ser móvel, mas apresentar lesões em diferentes compartimentos estruturais, como membranas do acrossoma, plasmática e mitocondrial (SILVA et al., 2009c). Para a avaliação da integridade destas membranas, diferentes métodos foram desenvolvidos visando determinar suas funções ou preservação estrutural.

Esfregaços úmidos de sêmen podem ser examinados por microscopia de contraste de fase após a fixação em glutaraldeído, formol-salino ou formol-citrato, com o objetivo de manter as características celulares e permitir futuras observações, analisando 200 células, no mínimo (MIES FILHO, 1982). Diversos corantes podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto para facilitar a visualização de estruturas da célula espermática, assim como determinar a sua preservação.

Segundo Rodríguez-Martínez et al. (1997), o desenvolvimento de técnicas de coloração celular utilizando a fluorescência como sondas para DNA, enzimas intracitoplasmáticas, lectinas ou potencial de membrana tem sido apontado como nova ferramenta para a avaliação da funcionalidade do espermatozoide após a prática de congelamento-descongelamento. As sondas fluorescentes ou fluoróforos monitoram a funcionalidade e/ou a integridade das estruturas espermáticas, as quais possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo diagnóstico prático e direto (CELEGHINI et al., 2007). Técnicas de fluorescência têm sido utilizadas com sucesso em diferentes espécies e em diferentes estruturas da célula espermática, podendo também ser utilizadas de forma isolada ou em associações nas espécies bovina (GARNER et al., 1997), equina (GRAVANCE et al., 2000), caprina (BATISTA et al., 2009) e ovina (SILVA et al., 2009c).

Para avaliação da integridade da membrana plasmática, sondas com afinidade por DNA são utilizadas. Uma vez lesada a membrana, a sonda atravessa esta estrutura e cora o núcleo, rico em DNA. Em revisão de Silva e Gadella (2006), foram listadas diferentes sondas utilizadas com esta finalidade: Hoechst 33258, YoPro-1, Iodeto de Propídeo (IP), Etídio Homodimérico-1, ToPro-3 e TOTO. Outra forma de avaliar a integridade da membrana é fazer uso de sondas classificadas como anfipáticas, que conseguem atravessar a membrana intacta e se ligar às esterases, identificando a célula como viável, como no caso do Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e do SYBR-14[®] (Figura 5). O DCF é um éster não polar, não fluorescente e permeável à membrana plasmática. Dentro da célula é hidrolisado por estereases inespecíficas, resultando em um composto fluorescente e impermeável à membrana plasmática intacta que fluoresce em verde (MEDINA et al., 2000).

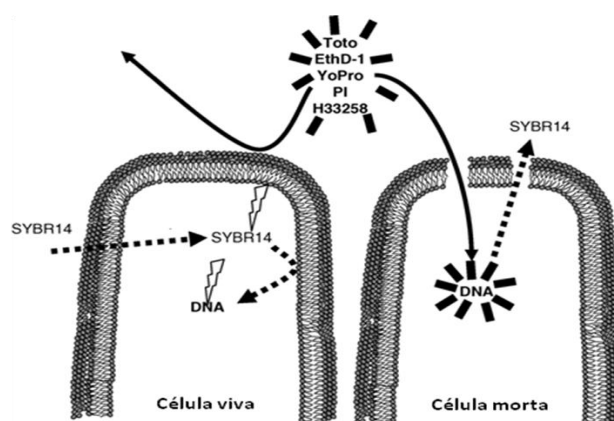


Figura 5. Esquema da ação das sondas que são utilizadas em testes de integridade da membrana plasmática. Fonte: Silva e Gadella (2006).

Geralmente se faz a associação destas sondas com outra que tenha afinidade com DNA, como o IP, onde são obtidos resultados confiáveis para identificar a preservação da membrana plasmática de espermatozoides, uma vez que a membrana íntegra cora em verde, pela ligação do DCF às esterases, por exemplo, e a lesada cora a região nuclear em vermelho pela ligação do IP ao núcleo celular (COLETO et al., 2002). Peterson et al. (2007), usando uma combinação de sondas fluorescentes (SYBR-14[®]/IP) presentes em um kit comercialmente vendido como LIVE/DEAD (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), na avaliação de sêmen de caprinos da raça Saanen, concluíram existir correlação entre a proporção de células com membranas intactas e a quantidade de espermatozoides móveis armazenados a 18 e 4 °C ($r= 0,77$ e $0,98$, respectivamente).

Além disso, evidenciaram que a porcentagem de espermatozoides vivos e a taxa média de partos apresentaram forte correlação ($r=0,44$ a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $r=0,27$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Silva e Gadella (2006) fizeram uma revisão sobre a avaliação da integridade do acrossoma e destacaram que as lectinas podem ser utilizadas, uma vez que são capazes de se ligar a carboidratos existentes exclusivamente nas glicoproteínas da membrana acrossomal (Figura 6). Substâncias geralmente derivadas da ervilha da espécie *Pisum sativum* (PSA) e do amendoim da espécie *Arachis hypogaea* (PNA), assim como a Concanavalina A (ConA), que é uma lectina D-glucose/D-manose ligante extraída de sementes da forrageira *Canavalia ensiformis*, são associadas a fluoróforos, para permitir sua visualização, sendo mais utilizado o Isocianato de Fluoresceína (FITC).

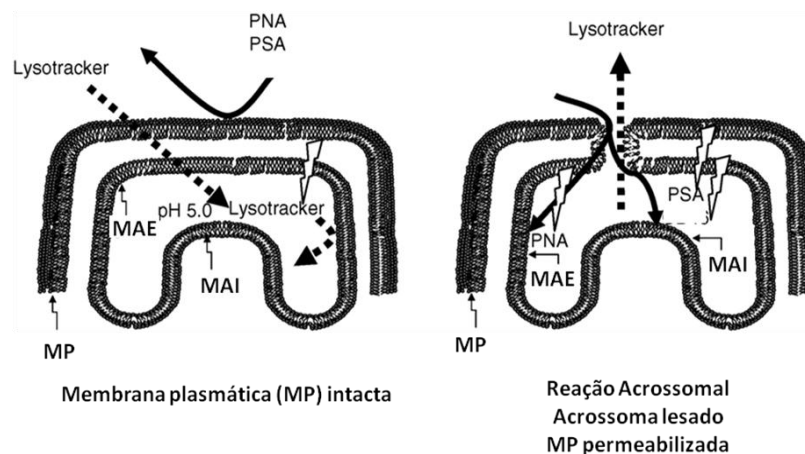


Figura 6. Esquema de ação das sondas fluorescentes nas membranas acrossomais externa (MAE) e interna (MAI). Fonte: adaptado de Silva e Gadella (2006).

Estas lectinas possuem diferentes locais de atuação, como a PNA, que se liga aos glicoconjugados da membrana acrossomal externa e as PSA e ConA que apresentam afinidade pela membrana acrossomal interna, mais especificamente aos grupos sacarídeos da glicoproteína pró-acrosina (HOLDEN et al., 1990). Desta forma, no caso do uso das PSA e ConA, quando a membrana plasmática está intacta não há fluorescência. Entretanto, quando a membrana plasmática está lesada, como nos casos de fixação da célula espermática, observa-se fluorescência na região do acrossoma (SILVA e GADELLA, 2006).

Outra forma de identificar alterações na matriz acrossomal é a utilização de sondas que tenham afinidade por pH ácido, já que o conteúdo acrossomal tem pH próximo a 5 (ABOU-HAILA e TULSIANI, 2000). A sonda fluorescente Lysotracker Green TM® (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) tem afinidade por pH ácido

contido em organelas, e marca células vivas. Quando o acrossoma está intacto, a sonda penetra a membrana plasmática e se concentra no interior do acrossoma, evidenciando fluorescência. Quando o acrossoma está reagido ou lesado, o interior do mesmo tem seu pH modificado para a neutralidade e a LysoTracker se perde no meio extracelular, sem apresentar fluorescência (SILVA e GADELLA, 2006).

Diferentes sondas fluorescentes têm sido utilizadas para avaliar a função mitocondrial espermática. As sondas mitocondriais são ativamente transportadas nas mitocôndrias com a respiração ativa. Portanto, quanto mais ativa a respiração mitocondrial mais corante é acumulado nestas organelas (GRAHAM e MOCÉ, 2005). Garner et al. (1997) testaram a ação dos fluoróforos Rodamina 123 (R123), JC-1 e MitoTracker™ (MITO) para avaliar a função mitocondrial da célula espermática de bovinos e identificaram que a sonda JC-1 foi eficaz na classificação do potencial da membrana mitocondrial.

As sondas R123 e MITO são transportadas nas mitocôndrias que apresentem respiração ativa e o acúmulo destas substâncias faz com que a peça intermediária fluoresça na coloração verde. Todas as mitocôndrias funcionais coram-se em verde com R123 e MITO, não havendo diferença entre as taxas respiratórias exibidas pelos espermatozoides (SILVA e GADELLA, 2006). Em contrapartida, o JC-1 apresenta diferenças quanto à coloração, uma vez que em concentrações mais baixas permanece no seu estado monomérico e fluoresce em verde, enquanto em concentrações elevadas o JC-1 forma agregados que fluorescem na cor laranja. Portanto, o JC-1 não apenas tem a habilidade para distinguir mitocôndria funcional, mas permite que os diferentes níveis de função mitocondrial sejam diferenciados pela intensidade da cor laranja na mitocôndria (GRAHAM e MOCÉ, 2005).

2.6.2 Avaliação ultraestrutural

O microscópio eletrônico foi inventado em 1932 por Ernst Ruska (1902-1988) e Max Knoll (1897-1969) e é classificado como um aparelho tecnológico com potencial de aumento muito superior ao seu congênere óptico. A microscopia eletrônica é uma importante técnica para determinar o tamanho e a forma de estruturas inorgânicas e biológicas, baseada na interação de elétrons incidentes sobre a matéria. Muitos são os efeitos desta interação e o comprimento de onda do elétron varia entre 0,1 e 1,0 nm. Não é possível observar material vivo neste tipo de microscópio, desta forma, o material a ser estudado passa por um complexo processo de desidratação, fixação e inclusão em

resinas especiais, muito duras, que permitem cortes ultrafinos obtidos com ultramicrotomo. Existem três tipos de microscópio eletrônico básico: o de transmissão (MET), usado para a observação de cortes ultrafinos; o de varredura (MEV), capaz de produzir imagens de alta ampliação para a observação de superfícies e o de tunelamento, para visualização de átomos (MANNHEIMER, 2002).

Por conseguinte, a avaliação da ultraestrutura dos espermatozoides de vertebrados e invertebrados tem sido estudada por meio da MET em galos (BAKST e HOWARTH Jr, 1975), pernilongos (BÁO e SOUZA, 1992) e bovinos (LUQUE e BÁO, 2006). Entretanto, estes estudos têm sido realizados em menor escala quando comparados às demais técnicas de avaliação espermática, em consequência dos custos operacionais. Pode-se afirmar que, embora a MET seja de difícil acesso, esta técnica é de extrema importância, uma vez que os testes utilizados rotineiramente não permitem avaliar as alterações que acontecem em proporções subcelulares ou em escala nanométrica (SARAIVA et al., 2009).

Chirinéa et al. (2006) estudaram a interferência de diferentes diluentes sobre a célula espermática de cães e verificaram que a MET foi utilizada como um teste descritivo e qualitativo, que possibilitou identificar lesões da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação, de difícil visualização em microscopia óptica.

Soares e Belletti (2006) avaliaram a ultraestrutura espermática de galos e identificaram que alterações na compactação da cromatina frequentemente não são acompanhadas por alterações morfológicas, porém as alterações morfológicas geralmente são acompanhadas por alterações na compactação da cromatina, que podem ser avaliadas pelas diferentes tonalidades de cinza expressas na região nuclear do espermatozoide. Sabe-se que alterações na cromatina como a descondensação podem interferir negativamente no índice de fertilidade (KASIMANICKAM et al., 2006). Silva et al. (2009a) avaliaram espermatozoides caninos submetidos ou não à criopreservação através da MET e identificaram que o processo de congelamento/descongelamento afetou diretamente a ultraestrutura das mitocôndrias, com presença de vacuolizações e desorganização, sendo relacionados por estes autores processo degenerativo celular.

Hashida et al. (2005) avaliaram a célula espermática de caprinos na condição *in natura*, após a criopreservação e pós-reação acrossomal, onde conseguiram identificar diferenças nas estruturas do acrossoma, membrana plasmática e mitocôndrias nas células expostas a reduzidas temperaturas. Entretanto, o axonema foi preservado em

todas as células avaliadas. Estes autores ainda relacionaram tais alterações à redução da motilidade espermática. Com o auxílio da MET, Le Guen e Crozet (1989) estudaram a fertilização de oócitos de ovelhas e identificaram que, ao contrário dos camundongos, o material da cauda espermática dos ovinos, como os centríolos, está envolvido nos eventos de fertilização.

Embora haja muitos trabalhos com a MET em diversas áreas da ciência veterinária, a identificação de estruturas da célula espermática *in natura* e após a criopreservação são muito escassos, principalmente na espécie ovina. Desta forma, diante das possibilidades de análises *in vitro* da célula espermática, o estudo sobre o espermatozoide ovino é possível e pode trazer informações importantes que possam diferenciar a espécie dos demais modelos previamente avaliados.

2.6.3 Avaliação *in vivo*

Fertilização é o encontro do espermatozoide com o oócito, havendo reconhecimento espécie-específico entre os dois gametas e consequente formação de um zigoto. Entretanto, segundo Mocé e Graham (2008), há diferentes meios de determinar a fertilidade, que pode ser definida como a porcentagem de fêmeas inseminadas e os embriões quantificados e posteriormente congelados; fêmeas com prenhez diagnosticada em um determinado período de tempo após a inseminação; fêmeas que não são re-inseminadas em um número definido de dias após a inseminação; fêmeas paridas (para as espécies múltiparas, o número de crias deve ser incluído). Esta definição é ainda mais difícil pelo fato de que o parâmetro fertilidade pode resultar de uma única inseminação, inseminações múltiplas dentro de um único ciclo estral ou muitas inseminações durante vários ciclos estrais (GRAHAM, 1996).

Rodríguez-Martínez (2007) afirma que técnicas de avaliação laboratorial podem expressar resultados confiáveis quanto ao poder fertilizante da célula espermática. Entretanto, devem ser correlacionadas com os resultados de IA. Por outro lado, a taxa de prenhez é uma característica binomial influenciada por diversos fatores, e, portanto, exige um grande número de fêmeas inseminadas para exprimir as diferenças significativas entre os tratamentos (COX et al., 2002).

Amann e Schanbacher (1983) relataram que os programas de IA realizados nas espécies equina, bovina leiteira e suína são mais aprimorados e frequentes quando comparados aos praticados na bovinocultura de corte e caprino-ovinocultura. No Brasil, e mais especificamente na região Nordeste, esta afirmação pode ser constatada, sendo a

criação de pequenos ruminantes basicamente de subsistência, com ausência ou pouca utilização de biotecnologias (VASCONCELOS e VIEIRA, 2005). Em virtude desta constatação, a capacitação técnica deve ser considerada no momento da IA, uma vez que a frequência de trabalho é relativamente menor quando comparado a outras culturas, interferindo diretamente na qualidade do serviço de IA em termos de experiência e às diferentes técnicas de inseminação, onde já foi evidenciado que a via de deposição de sêmen pode influenciar os resultados de prenhez na espécie ovina (MILCZWSKI e KOZICKI, 2000).

Segundo Cox et al. (2002), é possível avaliar a taxa de fertilização utilizando a técnica de transferência de oócitos homólogos colhidos em abatedouro, promover a IA e, a seguir, colher as estruturas para a análise. Em complemento, Cox et al. (2002) realizaram a transferência de oócitos bovinos obtidos em abatedouro para o sistema reprodutor de cabras, promoveram a IA com sêmen caprino e colheram as estruturas, comprovando a fertilização de oócitos heterólogos. Ressalta-se, entretanto, que os oócitos estavam desnudos ao serem transferidos, não sendo requerido o prévio reconhecimento espécie-específico entre espermatozoide-oócito. Desta forma, os autores validaram a técnica como uma alternativa para predizer a capacidade fertilizante da célula espermática ou comparar os resultados obtidos previamente *in vitro*.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOAGLA, E.M.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1160-1172, 2004.

ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D.R.P. Mammalian sperm acrosome: formation, contents and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 379, n. 2, p. 173-182, 2000.

AGARWAL, A.; PRABHAKARAN, S.A.; SIKKA, S.C. Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: Evidence-based analysis. **American Urology Association Update Series**, v. 26, p. 1-12, 2007.

ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 321-337, 2005.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; et al. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 6, p. 541-545, 2000.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 105-113, 2005.

AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.

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

AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 57, suppl. 2, p. 380-403, 1983.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.

ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. **Symposia of the Society for experimental biology**, v. 41, p. 395-406, 1987.

AUDET, I.; LAFOREST, J.P.; MARTINEAU, G.P. et al. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 626-633, 2004.

AX, R.L.; LENZ, R.W. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 7, p. 1477-1486, 1987.

AZEVEDO, D.M.M.R. Melhoramento genético de ovinos Santa Inês no Piauí. **Sapiência**, n. 1, 2004. Disponível: <www.fapepi.pi.gov.br/sapiencia/pesquisas6.php>.

- BALL, B.A.; BAUMBER, J.; SABEUR, K. Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, n. 2, p. 299-300, 2002.
- BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; et al. Catalase activity in equine semen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 9, p. 1026-1030, 2000.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BARRETO, S.C.S.; ZAPATA, J.F.F.; FREITAS, E.R.; et al. Ácidos graxos da gema e composição do ovo de poedeiras alimentadas com rações com farelo de coco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 12, p. 1767-1773, 2006.
- BAKST, M.R.; HOWART Jr., B. The head, neck and midpiece of cock spermatozoa examined with the transmission electron microscope. **Biology of Reproduction**, v. 12, p. 632-640, 1975.
- BÁO, S.N.; SOUZA, W. Distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes in the spermatid and spermatozoon of *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). **Biol Cell**, v. 75, p. 37-44, 1992.
- BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; et al. Efeito dos métodos *Swim-up* e Percoll sobre a viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais...**, Belo Horizonte: CBRA, p. 409, 2009.
- BAUDOT, A.; CACELA, C.; DUARTE, M.L.; et al. Thermal study of simple amino-alcohol solutions. **Cryobiology**, v. 44, n. 2, p. 150-160, 2002.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; et al. 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.
- BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; et al. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 60, p. 1239-1247, 2003.
- BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; et al. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 120-126, 2007. BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 10, p. 1338-1344, 2006.
- BERGMANN, A.R.; RAMOS, P.; HERMANN, E; et al. RRR-a-tocopherol can be substituted for by Trolox in determination of kinetic parameters of LDL oxidizability by copper. **Journal of Lipid Research**, v. 38, p. 2580-2588, 1997.

- BIANCHI, I.; COLLARES, T.; CAMPOS, V.F.; et al. Fator do plasma seminal associado à integridade de membrana de espermatozoides suínos pós descongelamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 384-388, 2008.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e técnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 120-127, 2003.
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, C.; GAGNON, C.; et al. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-288, 2001.
- BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; et al. Levels of antioxidant defense are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.
- BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALHOUB, M.C.L.; et al. Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 4, p. 305-312, 2008.
- BORGES JÚNIOR, E.; ROSSI, L.M.; ROCHA, C.C.; et al. Importância dos parâmetros seminais nos resultados de inseminação intra-uterina. **Revista Brasileira de Gineologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 4, p. 243-248, 2003.
- BRAGA, C.V.P.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R.; CARVALHO, L.E.; SOUSA, F.M.; BASTOS, S.C. Efeito da inclusão do farelo de coco em rações para poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 76-80, 2005.
- BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; O'FLAHERTY, C.M.; et al. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamics parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 2126-2135, 2005.
- BUCAK, M.N.; ATEŞŞAHIN, A.; VARIŞLI, Ö; et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, p. 1060-1067, 2007.
- BURKHEAD, T.R.; HOSKEN, D.J.; PITNICK, S. **Sperm Biology: an evolutionary perspective**. Oxford: Academic Press Title. ISBN: 9780123725684. 2009. 642 p.
- BURKS, D.J.; SALING, P.M. Molecular mechanisms of fertilization and activation of development. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 79-86, 1992.
- CALDERAM, I.B.K.; MASCHIO, É.F.; MADEIRA, E.M.; et al. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1978-1983, 2008.

- CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 93-99, 2008.
- CÂMARA, D.R.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; et al. Efeito da adição de antioxidantes ao meio diluidor na qualidade do sêmen ovino pós-descongelamento. In: SINCORTE - Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 4, 2009, João Pessoa-PB. **Anais...**, João Pessoa-PB, 2009. (CD-ROM).
- CARNEIRO, G.F.; SILVA, S.V.; MEDEIROS, L.R.D.; et al. Utilização prática de sêmen congelado. In: ASSIST – Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos, 1, 2007. **Anais...**, Gravatá-PE, 2007 (CD-ROM).
- CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A.; et al. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2002.
- CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.
- CAVALCANTE, J.M.M.; MENEZES, E.S.B.; BRASIL, O.O.; et al. Parâmetros cinéticos do sêmen fresco de ovinos da raça Santa Inês avaliados em sistema CASA. In: CONBRAVET – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 35, 2008, Gramado-RS. **Anais...**, Gramado-RS, 2008 (CD-ROM).
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2ª Ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1998. 49p.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 42, p. 479-488, 2007.
- CHAN, P.J.; CORSELLI, J.U.; PATTON, W.C.; et al. Enhanced fertility after heat-induced hyperactivation. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 1, p. 118-121, 1998.
- CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; et al. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 407-415, 2006.
- CHRISTOPHERSEN, B.O. The inhibitory effect of reduced glutathione on the lipid peroxidation of microsomal fraction and mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 106, p. 515-522, 1968.
- CHRISTOVA, Y.; JAMES, P.S.; JONES, R. Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 68, p. 365–372, 2004.
- COLETO, Z.F.; GUERRA M.M.P.; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 101-104, 2002.

- CORREIA, A.A.D.; CORREIA, J.H.R.D. **Bioquímica animal**. 2ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1985. 1223p.
- COX, J.F.; ZAVALA, A.; SARAVIA, F.; et al. Fertilization efficiency of in vitro matured oocytes transferred to oviducts of inseminated goats: a model to assess in vivo fertilization performance of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, p. 1-8, 2002.
- DALVIT, G.C.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T. Effect of α -tocoferol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 49, p. 619-627, 1998.
- DAVIES, M.J.; FORNI, L.G.; WILLSON, R.L. Vitamin E analogue Trolox C. E.s.r. and pulse-radiolysis studies of free-radical reactions. **Biochemistry Journal**, v. 255, n. 2, p. 513-522, 1988.
- De GRAAF, S.P.; EVANS, G.; GILLAN, L.; et al. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the *in vitro* quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, p. 217-227, 2007.
- De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.
- DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 3, p. 484-495, 1999.
- ELCHURI, S.; OBERLEY, T.D.; QI, W.; et al. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. **Oncogene**, v. 24, p. 367-380, 2005.
- ELSHAL, M.F.; El-SAYED, I.H.; ELSAIED, M.A.; et al. Sperm head defects and disturbances in spermatozoa chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 7-8, p. 589-594, 2009.
- FAHY, G.M. Analysis of "solution effects" injury. Equations for calculating phase diagram information of the ternary system NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water. **Biophysical Journal**, v. 32, n. 2, p. 837-850, 1980.
- FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen – New Challenges. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 336-341, 2009.
- FELTRE, R. **Fundamentos da química**. 4ª Ed. São Paulo: Moderna, 2005. 700p.
- FERNANDES, A.C.; HEROLD, B.; MAIA, H.; et al. **Guia IUPAC para a nomenclatura de compostos orgânicos**. Lisboa: Lidel, 2002. 220p.
- FERRARI, S. **Meios de capacitação espermática na espécie ovina (*Ovis aries*, Linnaeus, 1758): reação acrossômica e penetração *in vitro* em oócitos zona-free de hamster**. 1997. 71p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v. 53, p. 81-89, 2007.
- FLESCHE, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.
- FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 13-23, 2002.
- FRAZER, G.S.; BUCCI, D. M.; BROOKS, C.L. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in half-milliliter straws. **Theriogenology**, v. 46, n. 7, p. 1103-1115, 1996.
- FURTADO, C.E.; MORAES, G.V.; RIGOLON, L.P.; et al. Inseminação artificial de éguas Percheron e Bretão com sêmen fresco diluído em água de côco e leite em pó desnatado. **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 3, p. 627-632, 1999.
- GADELLA, B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 229-236, 2008.
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.
- GILBERTI, M.; MONREAL, A.C.D. Identificação do intervalo de tempo fixo para o emprego da inseminação artificial laparoscópica com sêmen congelado em ovelhas Santa Inês. **Agrarian**, v. 1, n. 2, p. 123-132, 2008.
- GILLAN L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M.C.; et al. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 201-214, 2008.
- GILLER, G., SINGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiologica**, v. 40, n. 2, p. 131-152, 1995.
- GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practices**, v. 12, p. 119-130, 1996.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 492-504, 2005.
- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; et al. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, p. 1691-1703, 2000.

- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.H.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p 187-195, 2004.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª Ed. São Paulo: Manole, 2004.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179-1180, 2000.
- HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H.; et al. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrosome-reacted goat sperm. **Biomedical Research**, v. 16, n. 2, p. 119-123, 2005.
- HIWASA, M.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; OKABE, K.; FUKUI, Y. Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v. 55, n. 1, p. 50-54, 2009.
- HOLDEN, C.A.; HYNE, R.V.; SATHANANTHAN, A.H.; et al. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, n. 3, p. 247-257, 1990.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.
- HOUPALATHI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M.; et al. **Bioactive Egg Compounds**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. 296p.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Anuário Estatístico do Brasil**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 1, 2008.
- IRVINE, D.S. Glutathione as a treatment for male infertility. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 6-12, 1996.
- ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; KATKOV, I.I. et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. **Human Reproduction**, v. 19, n. 4, p. 932-939, 2004.
- JAIN, S.K.; McVIE, R.; SMITH, T. Vitamin E supplementation restores glutathione and malondialdehyde to normal concentrations in erythrocytes of type 1 diabetic children. **Diabetes Care**, v. 23, n. 9, p. 1389-1394, 2000.
- JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M.; et al. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 32, n. 3-5, p. 99-107, 2003.
- JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-268, 1977.
- KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science**, v. 114, n. 1-3, p. 125-134, 2009.

- KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; FORTE, T.; et al. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 385-397, 1992.
- KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; PACKER, L. Recycling and antioxidant activity of tocopherol homologues of differing hydrocarbon chain length in liver microsomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 282, n. 2, p. 221-225, 1990.
- KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; et al. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and Catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. **Theriogenology**, v. 63, p. 1354-1365, 2005.
- KASIMANICKAM, R.; PELZER, K.D.; KASIMANICKAM, V.; et al. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, v. 65, p. 1407-1421, 2006.
- KASHIWAZAKI, N.; OKUDA, Y.; SEITA, Y.; et al. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White Rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 4, p. 511-516, 2006.
- KATZ, D.F.; DAVIS, R.O. Automatic analysis of human sperm motion. **Journal of Andrology**, v. 8, n. 3, p. 170-181, 1987.
- KATZER, L.H.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; et al. Viabilidade de sêmen suíno armazenado a 5 °C de acordo com a taxa de resfriamento e incubação prévia. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 138-144, 2005.
- KAWAKAMI, E.; TAKEMURA, A.; SAKUMA, M.; et al. Superoxide dismutase and Catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 62, n. 2, p. 133-136, 2007.
- KNAPEN, M.F.C.M.; ZUSTERZEEL, P.L.M.; PETERS, W.H.M.; et al. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction - A review. **European Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 82, p. 171-184, 1999.
- KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 2, p. 151-157, 1996.
- KUMAR, S. Cellular damages during cryopreservation and assessment of *in vitro* fertilizing capacity of spermatozoa. **Indian Veterinary Medicine Journal**, v. 24, p. 1-6, 2000.
- KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v. 46, p. 246-253, 2003.
- LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v. 165, p. 1-10, 1998.
- LARSEN, L.; SCHEIKE, T.; JENSEN, T.K.; et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. **Human Reproduction**, v. 15, n. 7, p. 1562-1567, 2000.

Le GUEN, P.; CROZET, N. Microtubule and centrosome distribution during sheep fertilization. **European Journal of Cell Biology**, v. 48, n. 2, p. 239-249, 1989.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 3, p. 246-256, 1996.

LI, Y.; HUANG, T.; CARLSON, E.J.; et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nature Genetics**, v. 11, p. 376-381, 1995.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.

LUKOSEVICIUTE, K.; ZILINSKAS, H.; JANUSKAUSKAS, A. A The effect of oestradiol, progesterone and heparin on bovine spermatozoa function after thawing. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 2, p. 100-107, 2005.

LUQUE, M.C.A.; BÁO, S.N. Structural and ultrastructural characterization of Zebu (*Bos indicus*) spermatozoa. **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 33-38, 2006.

LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 2, 2000.

MACHADO, V.P.; NUNES, J.F.; ARAÚJO, A.A.; et al. Fertilidade após a inseminação artificial intracervical ou laparoscópica intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, suplemento, p. 43-49, 2006.

MANNHEIMER, W.A. **Microscopia dos materiais**. Rio de Janeiro: E-papers serviços editoriais LTDA, 2002. 221 p.

MARTI, E.; MARTI, J.I.; MUINÑO-BLANCO, T.; et al. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 4, p. 459-467, 2008.

MATOS, D.I.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, L.G.; et al. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.

MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction and Fertility Development**, n. 8, p. 1013-1020, 1996.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

- MEDINA, V. H.; VICENTE, W. R. R.; ESPER, C. R.; et al. Uso de sondas fluorescentes para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos antes e após congelamento. **ARS Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 204-209, 2000.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial**. 5ª Ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. 344 p.
- MILCZWSKI, V.; KOZICKI, L.E. Inseminação artificial ovina com sêmen refrigerado aplicado em diferentes vias. **Scientia Agraria**, v. 1, n. 1-2, p. 83-95, 2000.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. *In vitro* evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 104–118, 2008.
- MORTIMER, D. Objective analysis of sperm motility and kinematics. In: KEEL, B.A.; WEBSTER, B.W. **Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 97-133.
- MORTIMER, D. Sperm preparations methods. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 3, p. 357-366, 2000a.
- MORTIMER, S.T. CASA – Practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000b.
- MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p. 285-291, 2004.
- MORTIMER, S.T.; SWAN, M.A.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, n. 8, p. 2139-2146, 1998.
- MULLER, F.L.; SONG, W.; LIU, Y.; et al. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 11, p. 1993-2004, 2006.
- NEID, D.M.; GADELLA, B.M.; COLLENBRANDER, B.; et al. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 295-298, 2002.
- NEILL, J.; OLDS-CLARKE, P. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. **Gamete Research**, v. 18, n. 2, p. 121-140, 1987.
- NISHIKIMI, M.; MACHLIN, L.J. Oxidation of α -tocopherol model compound by superoxide anion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 170, p. 684-689, 1975.
- NUNES, J.F. Inseminação artificial em caprinos. In: GONSALVEZ, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, p. 111-125, 2002.
- OHATA, P.M.; WENTZ, I.; BERNARDI, M.L.; et al. Viabilidade do sêmen suíno congelado submetido a um período de equilíbrio pré-congelamento com ou sem a presença de plasma seminal. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, v. 29, n. 2, p. 123-129, 2001.

- OLIVEIRA, E.C.S.; JULIANI, G.C.; MARQUES Jr, A.P.; et al. *In vitro* evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1116-1122, 2006.
- ORTEGA, A.M.; IZQUIERDO, A.C.; GOMEZ, J.J.H.; et al. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión. **Interciência**, v. 28, n. 12, p. 699-704, 2003.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; HANDROW, R.H. et al. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 5, p. 1020-1025, 1989.
- PASQUALOTTO, F.F.; PASQUALOTTO, E.B.; UMEZU, F.M.; et al. Atividades da superóxido-dismutase e Catalase no sêmen de homens férteis e inférteis. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 50, n. 2, p. 130-134, 2006.
- PEGG, D.E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n. 1, p. 05-14, 2002.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; et al. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85-98, 2003.
- PETERSON, K.; KAPPEN, M.A.P.M.; URSEM, P.J.F.; et al. Microscopy and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. **Theriogenology**, v. 67, p. 863-871, 2007.
- PETRUNKINA, A.M. Fundamental aspects of gamete cryobiology. **Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie**, v. 4, n. 2, p. 78-91, 2007.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597-612, 2006.
- PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal of Dairy Science**, v. 23, n. 5, p. 399-404, 1940.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- RAIJMAKERS, M.T.M.; ROELOFS, H.M.J.; STEEGERS, E.A.P.; et al. Glutathione and glutathione s-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 1, p. 169-172, 2003.
- RIBEIRO, B.R.C.; LARA, L.J.C.; BAIÃO, N.C.; et al. Efeito do nível de ácido linoléico na ração de matrizes pesadas sobre o peso, composição e eclosão dos ovos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 789-796, 2007.

- RICKER, J.V.; LINFOR, J.J.; DELFINO, W.J.; et al. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 359–365, 2006.
- RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S.; et al. Role of Hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 518-522, 2004.
- ROCA, J.; RODRIGUEZ, M.J.; GIL, M.A.; et al. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of Superoxide dismutase and/or Catalase. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 1, p. 15-24, 2005.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 312-318, 2003.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 91-101, 2007.
- ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo meabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.
- SAACKE, R.G. Components of semen quality. **Journal of Animal Science**, v. 55, n.2, p. 1-13, 1982.
- SALVIANO, M.B.; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 3, p. 159-167, 2008.
- SANTOS, A.D.F.; SANTOS, D.C.; CONCEIÇÃO, J.C.; et al. Taxa de gestação em fêmeas Santa Inês inseminadas pela via transcervical com sêmen fresco associada ou não à anestesia epidural. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, p. 224-230, 2009.
- SARAIVA, K.L.A.; SILVA, A.K.S.E.; WANDERLEY, M.I.; ARAÚJO, A.A.A.; SOUZA, J.R.B.; PEIXOTO, C.A. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, p. 454-462, 2009.
- SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 2, p. 235-245, 2002.
- SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.
- SCOTT, J.W.; CORT, W.M.; HARLEY, H.; et al. 6-hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 51, p. 200-203, 1974.
- SENGER, P. L. Spermatozoa in the female tract: transport, capacitation e fertilization. In: _____. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2ª Ed. Moscow: Current Conceptions, Inc, Cap. 12, p. 266- 283, 2003.
- SI, Y.; OKUNO, M. The sliding of the fibrous sheath through the axoneme proximally together

- with microtubule extrusion. **Experimental Cell Research**, v. 208, p 170-174, 1993.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.
- SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; et al. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 595-601, 2009a.
- SILVA, K.M.G.; MORAES, T.A.P.; SILVA, E.C.B.; et al. Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides equinos após descongelamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 42-49, 2009b.
- SILVA, K.M.G.; GAMBOA, S.C.; RODRIGUES, A.S.; et al. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelamento de sêmen de garanhões férteis e subférteis. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2271-2277, 2008.
- SILVA, P.N.F.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; et al. Criopreservação de sêmen ovino em diferentes estações climáticas: interferência da sazonalidade. In: SINCORTE - Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 4, 2009, João Pessoa-PB. **Anais...**, João Pessoa-PB, 2009c. (CD-ROM).
- SIMPLÍCIO, A.A. Estratégias de manejo reprodutivo como ferramenta para prolongar o período de oferta de carnes caprina e ovina no Brasil. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 3, p. 29-39, 2008.
- SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K.; et al. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 237-243, 1996.
- SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; et al. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 387-395, 2007.
- SNOECK, P.P.das N. **Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade**. 2003, 116p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.
- SOARES, A.T.; SILVA, S.V.; LEMOS, P.F.B.A.; et al. Atividade mitocondrial, integridade de membrana plasmática e motilidade de espermatozoides caprino submetidos à criopreservação em meio adicionado de glutathione reduzida. In: SINCORTE - Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 4, 2009, João Pessoa-PB. **Anais...**, João Pessoa-PB, 2009. (CD-ROM).

- SOARES, J.M.; BELETTI, M.E. Avaliação da morfologia e da compactação cromatínica em espermatozoides de galo (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) através de microscopia eletrônica de transmissão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 554-560, 2006.
- SOUSA, D.B.; BICUDO, S.D. Inseminação artificial com sêmen ovino refrigerado por 24 horas e transportado no sistema Equitainer[®]. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 330-332, 2003.
- SOUZA, A.F.; LEITÃO, M.C.C.; BATISTA, A.M.; et al. Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1155-1161, 2009.
- SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHEM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1056-1065, 2004.
- STEDMAN, T.L. **Stedman: dicionário médico**. 27^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 2196p.
- STEFANOV, R.; ANGELOVA, M.; STEFANOVA, T.; et al. Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103 improves ram spermatozoa functions *in vitro*. **Andrologia**, v. 36, p. 51-56, 2004.
- STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 203-214, 1997.
- TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 189-198, 2001.
- THOMAS, A.D.; MEYERS, SA; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1531-1550, 2006.
- TOSHIMORI, K.; ITO, C. Formation and organization of the mammalian sperm head. **Archives of Histology and Cytology**, v. 66, n. 5, p. 383-396, 2003.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; et al.. Studies on aromatic aminoacid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, v. 51, p. 275-287, 1998.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E.; et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 269-278, 1997.
- UZUNIAN, A.; PINSETA, D.E.; SASSON, S. **Introdução à Biologia**. Volume 1. São Paulo: Gráfica e Editora Anglo, p. 97-105, 1991.
- VALENTE, S. S.; PEREIRA, R. M.; BAPTISTA, M. C.; et al. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 74-77, 2010.

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

VASCONCELOS, V.R.; VIEIRA, L.S.A. **Evolução da caprino-ovinocultura brasileira**. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br>> Acesso em: 10 de novembro de 2005.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIANA, J.G.A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, v. 4, n. 12, 2008.

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

VISCONTI, P.E.; WESTBROOK, V.A.; CHERTIHIN, O.; et al. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, n. 1-2, p. 133-150, 2002.

WATSON, P.F. The protection of ram and bull spermatozoa by the low-density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5 °C and deep-freezing. **Journal of Thermal Biology**, v. 1, n. 3, p. 137-141, 1976.

WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 483-492, 1981.

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

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

WILLIAMS, A.C.; FORD, W.C.L. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 4, p. 929-936, 2005.

XU, X.; POMMIER, S.; ARBOV, T.; et al. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3079-3089, 1998.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994, p.189-317.

YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 99-111, 2003.

YUE, D.; YAN, L.; LUO, H. et al. Effect of vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 217-222, 2010.

4 EXPERIMENTOS

4.1 Avaliações *in vitro* e *in vivo* de espermatozoides ovinos criopreservados em Tris-gema suplementados com superóxido dismutase e glutathione reduzida

In vitro and in vivo evaluations of sperms ram frozen in Tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and glutathione

Sildivane Valcácia Silva¹, Adriana Trindade Soares^{1,2}, André Mariano Batista^{1,3}, Felipe Costa Almeida¹, Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Júnior¹, José Ferreira Nunes⁴, Christina Alves Peixoto⁵, Maria Madalena Pessoa Guerra^{1*}

¹Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE.

Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n. Dois Irmãos, Recife – PE. CEP: 52171-900;

²Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – EMEPA, João Pessoa, PB;

³Curso de Doutorado da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO;

⁴Laboratório de Tecnologia do Sêmen, UECE, Fortaleza, CE;

⁵Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) – Recife, PE.

*E-mail: mpguerra@dmv.ufrpe.br.

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar *in vitro* e *in vivo* o efeito da adição de superóxido dismutase (SOD) e glutathione reduzida (GSH) ao diluente de congelação do sêmen ovino. Foram utilizados cinco reprodutores ovinos da raça Santa Inês, com histórico de fertilidade, sendo os ejaculados obtidos pelo método de vagina artificial. Após avaliação, os ejaculados foram submetidos à formação do *pool*, diluído em Tris-gema e glicerol 5%, acrescido de antioxidantes, de acordo com os grupos experimentais (G1= Controle; G2= 25 U/mL de SOD; G3= 50 U/mL de SOD; G4= 100 U/mL de SOD; G5= 2 mM de GSH; G6= 5 mM de GSH; G7= 7 mM de GSH), na concentração de 240×10^6 espermatozoides/mL. O sêmen foi acondicionado em palhetas (0,25 mL), congelado utilizando o sistema automatizado e armazenado em nitrogênio líquido (-196 °C). Para a análise *in vitro*, as amostras, após descongelação (37 °C/30 segundos), foram submetidas à análise de integridade das membranas plasmática (iMP) e acrossomal (iAc), potencial de membrana mitocondrial (PMM), cinética e ultraestrutura dos espermatozoides. Na avaliação *in vivo*, o sêmen foi utilizado em programa de transferência de embriões. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre grupos para motilidade total (MT), retilinearidade (STR) e índice de oscilação (WOB), sendo o GSH 7mM inferior na MT e superior na STR e os grupos GSH 5 e 7 mM com maior índice de oscilação em comparação ao Controle, SOD 25 e 100 U/mL. Na análise ultraestrutural, evidenciou-se que o acrossoma foi melhor preservado após a congelação nos grupos SOD 50 e 100 U/mL e GSH 5 e 7 mM ($P < 0,05$), enquanto que as mitocôndrias do grupo Controle e do GSH 7 mM sofreram maiores danos ($P < 0,05$). Para a fertilização *in vivo*, o grupo SOD conferiu resultados numericamente superiores ao grupo GSH. De acordo com os resultados, é possível concluir que a adição de GSH na concentração de 7 mM não preserva a viabilidade de espermatozoides ovinos congelados, enquanto a adição de SOD 100 U/mL ao diluente Tris-gema confere proteção às membranas da célula espermática pós-criopreservação.

Palavras-chaves: antioxidantes, inseminação, membranas espermáticas, ultraestrutura.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* effect of the addition of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) to ram semen freezing extender. Five Santa Inês breed ram were used, with history of fertility, and the ejaculates were obtained by artificial vagina. Pool of semen samples were diluted in Tris egg-yolk plus glycerol 5% supplemented with antioxidants, according to experimental groups (G1=Control; G2= 25 U/mL SOD; G3= 50 U/mL SOD; G4= 100 U/mL SOD; G5= 2 mM GSH; G6= 5 mM GSH; G7= 7 mM GSH), at concentration of 240×10^6 spermatozoa/mL. The semen was stored in 0.25mL straws, frozen using an automated system and stored in liquid nitrogen (-196 °C). After thawing (37 °C/30 second), samples were subjected to analysis of plasma membrane (iMP) and acrosomal integrity (iAc), mitochondrial membrane potential (MMP), kinematics and ultrastructure spermatozoa's. In *vivo*, the semen was used in embryo transfer program. In the evaluation of post-thawing semen, there were no significant difference among groups for the values of iMP, iAC and PMM. Significant differences ($P < 0.05$) were observed among groups for total motility (MT), straightness (STR) and wobble (WOB), where GSH 7 mM group was lower for MT and higher in STR for GSH 5 e 7 mM groups with higher wobble than control, SOD 25 and 100 U/mL groups. The ultrastructural analyses showed that acrosome was better preserved after freezing in SOD 50 and 100 U/mL groups and GSH 5 and 7 mM ($P < 0.05$) than other groups, whereas mitochondria from the control group together with 7 mM GSH suffered further damage. The plasma membrane remained preserved after freezing, regardless of group. For *in vivo* fertilization, the SOD group gave better results than the GSH group ($P > 0.05$). According to the results, it can be concluded that the addition of GSH 7 mM does not preserve the viability of spermatozoa post-freezing, while the addition of SOD 100 U/mL in Tris egg-yolk extender gives protection to the membranes of sperm cells after freezing.

Keywords: antioxidants, insemination, sperm membranes, ultrastructure.

1 INTRODUÇÃO

Os processos de criopreservação utilizados para o sêmen nas diferentes espécies causam estresse físico e químico às membranas espermáticas, além de estresse oxidativo associado à maior produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), as quais têm a capacidade de reduzir a viabilidade espermática e, conseqüentemente, a habilidade fertilizante do espermatozoide (WATSON, 2000). Embora pequenas quantidades de ROS sejam requeridas para iniciar as funções espermáticas, como capacitação e indução da reação acrossômica (LAMIRANDE e GAGNON, 1993), é necessário manter o equilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade de proteção antioxidante do meio para assegurar a viabilidade dos gametas (CASTELLINI et al., 2002).

O organismo apresenta dois tipos de defesa antioxidante, enzimática e não enzimática. A glutatona reduzida (GSH), antioxidante não enzimático, pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra lesões principalmente no DNA (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A superóxido dismutase (SOD), de ação enzimática, tem um importante papel antioxidante, uma vez que catalisa a dismutação do radical ânion superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), além de proteger o DNA espermático de possíveis lesões. Sabe-se que os processos de criopreservação estão associados à redução dos níveis orgânicos de GSH (GARDÓN et al., 2003) e SOD (STEFANOV et al., 2004), provavelmente ocasionada pela diluição do sêmen, favorecendo o aumento da produção de ROS e, conseqüentemente, das lesões às células espermáticas (GUERRA et al., 2004).

Assim, a adição da SOD, em associação ao cobre e zinco, tem sido testada em diluentes de criopreservação. Stefanov et al. (2004) adicionaram três diferentes concentrações de SOD (30, 60 e 120 U/mL) na incubação de sêmen ovino por cinco horas, a 39 °C, e observaram que as maiores doses de SOD foram mais eficazes, enquanto que a dosagem mais baixa não teve efeito. Estes autores afirmaram que a administração exógena de SOD suprimiu a formação de H_2O_2 .

Sinha et al. (1996) testaram a adição de GSH na criopreservação de sêmen caprino, nas concentrações de 2 e 5 mM e identificaram resultados satisfatórios na taxa de fertilização com a adição de 5mM da GSH, em comparação ao grupo controle. Soares et al. (2009) testaram a adição de 2, 5 e 7 mM de GSH na criopreservação de sêmen caprino e, diferente dos resultados obtidos por Sinha et al. (1996), observaram que a melhor concentração de GSH foi a de 2 mM. Por conseguinte, diante dos resultados divergentes observados na literatura, objetivou-se com este trabalho avaliar *in vitro* e *in vivo* o efeito da adição de SOD e GSH ao diluente de congelamento do sêmen ovino.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e Período do Experimento

O experimento foi realizado na Estação Experimental Benjamin Maranhão, localizada no município de Tacima, região de clima tropical semiárido (06°29'18" de latitude sul e 35°38'14" de longitude oeste), com altitude de 168 metros e precipitação

média anual de 431,8 mm³ (BRASIL, 2005). As colheitas e criopreservação do sêmen foram realizadas no período de junho de 2009, segundo estudos prévios que determinaram melhor qualidade espermática na época chuvosa (SILVA et al., 2009b).

2.2 Animais e Colheita de Sêmen

Foram utilizados cinco reprodutores ovinos da raça Santa Inês, sexualmente maduros e com histórico de fertilidade. Os ejaculados foram obtidos pelo método de vagina artificial, com o uso de uma fêmea em estro como manequim, colhidos em dias alternados. Foram colhidos oito ejaculados de cada reprodutor, totalizando 40 ejaculados.

2.3 Análise e Criopreservação do Sêmen

Inicialmente, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto aos parâmetros de turbilhonamento, motilidade e vigor em microscópio de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com a colocação de 10 µL em lâmina previamente aquecida (37 °C) para turbilhonamento e deposição de lamínula 20x20 sobre a gota para avaliação de motilidade e vigor. A concentração espermática foi obtida em câmara de Neubauer, na diluição de 1:200, em formol salino. Para análise da morfologia espermática, utilizou-se o método de câmara úmida (CBRA, 1998).

O sêmen de cada reprodutor foi avaliado separadamente, de acordo com o Manual de Andrologia do CBRA (1998) e, quando aprovados (turbilhonamento ≥ 3 ; motilidade $\geq 70\%$; vigor ≥ 3 ; concentração espermática $\geq 1,0 \times 10^9$ /mL e patologias espermáticas $\leq 20\%$), submetidos à formação do *pool*. Em seguida, o *pool* foi diluído em meio de criopreservação Tris-gema (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488 g de frutose; 100 mL de água ultrapura; 20% de gema de ovo, 5% de glicerol, pH 7,2), acrescido de antioxidantes, de acordo com os grupos experimentais [G1= grupo controle, sem adição de antioxidantes; G2= 25 U/mL de SOD (Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA); G3= 50 U/mL de SOD; G4= 100 U/mL de SOD; G5= 2 mM de GSH (Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA); G6= 5 mM de GSH; G7= 7 mM de GSH], na concentração final de 240×10^6 espermatozoides/mL.

A seguir, o sêmen foi acondicionado em palhetas (0,25 mL) e congelado utilizando o sistema automatizado (TK-3000[®], TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, Brasil), na curva de refrigeração de -0,25 °C/minuto, iniciada a 28 °C, temperatura ambiente. Após alcançar temperatura de 5 °C, os grupos foram submetidos

ao tempo de estabilização, com duração de 120 minutos. A curva de congelação foi procedida imediatamente após o período de estabilização, com redução de -15 °C/minuto, até alcançar -120 °C. Em seguida, as palhetas foram imersas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

2.4 Descongelação e Análise Espermática *in vitro*

As amostras de sêmen criopreservadas foram descongeladas (37 °C por 30 segundos) após 30 dias de armazenamento e submetidas à análise de integridade de membrana plasmática e acrossoma, função mitocondrial, cinética e ultraestrutura dos espermatozoides.

Integridade de membrana plasmática

Para esta avaliação, utilizou-se o método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e Iodeto de Propídeo (IP), modificado por Coletto et al. (2002). Alíquotas de 50 µL de sêmen foram diluídas em 150 µL de Tris (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488 g de frutose, 100 mL de água bidestilada; pH 6,8), contendo 5 µL de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 µL de IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos a 37 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com aumento de 400x, usando filtro de emissão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485-520 nm, e classificado com membrana intacta, quando se apresentava corado em verde, e com membrana danificada, quando corado em vermelho.

Integridade do acrossoma

Para determinar este parâmetro, os espermatozoides foram corados com Isotiocianato de Fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA), de acordo com técnica descrita por Roth et al. (1998). Alíquotas de 5 µL de sêmen foram preparadas para esfregação e secadas ao ar. Uma alíquota de 100 µL da solução estoque de FITC-PNA (1 mg/mL) foi descongelada e adicionada a 900 µL de PBS para obter a concentração final de 100 µg/mL. Alíquotas (10-20 µL) desta solução foram colocadas sobre lâminas, as quais foram incubadas por 15 minutos em câmara úmida a 4 °C, na ausência de luz. Após incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS refrigerado (4 °C) e colocadas para secagem na ausência de luz.

Imediatamente antes da avaliação, 5 μ L de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de p-phenylenediamine) foi colocado sobre a lâmina e coberto com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x sob óleo de imersão em microscopia de epifluorescência, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os gametas foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentavam a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou acrossomas reagidos, quando apresentavam faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda cabeça da célula.

Função mitocondrial

A função mitocondrial dos espermatozoides foi determinada pela utilização do fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE e WELCH, 2006). Alíquotas de 50 μ L de sêmen foram diluídas em 150 μ L de Tris contendo 5 μ L de JC-1 (0,15 mM em DMSO), incubadas por 10 minutos a 38 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de Glutaraldeído. Duzentos espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência, com aumento de 1000x sob óleo de imersão, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. As células que apresentavam a peça intermediária corada em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

Cinética espermática

Duas palhetas de cada grupo foram descongeladas em banho-maria, na temperatura de 37 °C, por trinta segundos. Amostras de sêmen foram diluídas em solução fisiológica (0,9% NaCl), com o objetivo de reduzir a concentração espermática (50 milhões de espermatozoides/mL) e a densidade do diluidor à base de gema, e facilitar a captação das imagens, evitando sobreposição das células espermáticas, segundo Mortimer (2000). A análise foi realizada utilizando-se a Câmara de Makler[®] (Sefi Medical Instrument, Haifa, Israel), com capacidade para 10 μ L, previamente aquecida a 37 °C. A câmara foi levada ao microscópio de contraste de fase (Nikon[™] H5505, Eclipse 50i, Japão) e as imagens capturadas por uma vídeo-câmera (Basler Vision Technologie[™] A312FC, Ahrensburg, Alemanha).

Pelo sistema CASA (Sperm Class Analyzer – SCATM, Microoptics, S.L., Version 3.2.0, Barcelona, Espanha) foram avaliados os seguintes parâmetros: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e oscilação (WOB), sendo estes expressos em porcentagem; velocidade curvilinear (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média do percurso (VAP), expressos em micrômetros por segundos; amplitude do descolamento lateral da cabeça espermática (ALH), expresso em micrômetros e a frequência do batimento flagelar cruzado (BCF), expressa em Hertz.

Análise ultraestrutural

A análise da ultraestrutura espermática foi realizada através da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Amostras de sêmen *in natura* e pós-congelação foram lavadas três vezes (600 g x 5 minutos) em tampão Cacodilato de Sódio a 0,1 M (pH 7.2), e fixadas *overnight* em solução contendo Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 2,5% e tampão Cacodilato de Sódio. Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas numa solução contendo 1% de Tetróxido de Ósmio, 2 mM CaCl₂ e 0,8% de Ferricianeto de Potássio em tampão Cacodilato 0,1 M (pH 7.2). A seguir, as amostras de sêmen foram desidratadas em série crescentes de acetona, infiltradas e emblocadas em resina SPIN-PON (Embed 812; Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA). A polimerização foi feita a 60 °C por 72 horas. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo, mantidos em grades de níquel de 300-mesh, contrastados com 5% de Acetato de Uranila e Citrato de Chumbo (SARAIVA et al., 2009). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgani 268D (FEI Company, Eindhoven, Holanda).

Inicialmente realizou-se a avaliação descritiva das estruturas do espermatozoide, considerando a interpretação qualitativa da técnica. Para a análise quantitativa da célula espermática e comparação entre grupos, foram contadas 60 estruturas por cada grupo, sendo divididas entre cabeça e cauda. Na região da cabeça espermática foram avaliadas as estruturas do acrossoma, membrana plasmática e núcleo. Na região da cauda, analisou-se mitocôndria, membrana plasmática e axonema.

2.5 Testes *In vivo*

Para avaliação *in vivo* da viabilidade do sêmen ovino criopreservado, foram utilizadas as técnicas de superovulação, inseminação artificial laparoscópica e colheita

dos embriões. Inicialmente, foram selecionadas nove fêmeas ovinas da raça Santa Inês, segundo o histórico reprodutivo, condições sanitárias e avaliação ultrassonográfica, utilizando o aparelho modelo Pie Medical Falcon 100 (Nutricell, Campinas, SP, Brasil). As fêmeas foram divididas em três diferentes grupos experimentais: I1= ovelhas inseminadas com sêmen do grupo controle, sem antioxidantes (n= 3); I2= ovelhas inseminadas com sêmen do grupo contendo 2 mM de GSH (n= 3); I3= ovelhas inseminadas com sêmen do grupo contendo 100 U/mL de SOD (n= 3). As amostras de sêmen pertencentes aos dois grupos contendo antioxidantes (I2 e I3) foram escolhidas após os resultados das avaliações *in vitro*, realizadas com as sondas fluorescentes, que se apresentavam numericamente superiores aos demais grupos.

Superovulação

Pessários vaginais (CIDR, Intervet, Cotia, SP, Brasil) foram colocadas nas ovelhas no início do programa de superovulação, correspondendo ao dia zero (D0). No oitavo dia (D8), os pessários foram substituídos por outro dispositivo novo e, no décimo primeiro dia (D11), foram administrados 250 UI de Hormônio Folículo Estimulante (FSH; Pluset, Calier, Barcelona, Espanha), em seis doses decrescentes, no intervalo de 12 horas entre as aplicações. No momento da última aplicação de FSH (D13), removeu-se o CIDR e administrou-se 200 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG; Folligon, Intervet, Cotia, SP, Brasil).

Inseminação laparoscópica

As fêmeas foram submetidas a jejum alimentar de 12 horas e hídrico de seis horas, sedação com Cloridrato de Xylazina a 2% (Rompum, Bayer, SP, Brasil) e contenção em macas cirúrgicas. Foram realizadas duas inseminações laparoscópicas, sendo a primeira IA 48 horas pós-remoção dos pessários e a segunda 12 horas após a primeira IA.

Colheita dos embriões

Cinco dias após a última inseminação, as ovelhas foram submetidas a jejum alimentar e hídrico, da mesma forma descrita para IA. No sexto dia após IA, as ovelhas foram sedadas com associação de Sulfato de Atropina a 1% (UCB, Jaboticabal, SP, Brasil) e Cloridrato de xylazina a 2%.

Para utilização da técnica de laparotomia, as ovelhas foram contidas em maca cirúrgica, e procedeu-se a tricotomia e higienização da área cirúrgica. Após incisão de 10 cm na região retoabdominal, exposição e abertura da linha Alba, os cornos uterinos foram localizados, lavados individualmente com 40 mL de PBS Dubelcco modificado (DMPBS-FLUSH®, Nutricell, Campinas, SP, Brasil), acrescido de 1,0% de Embryo Holding Solution (Emcare®, ICPBio, Canton, Texas, USA), na temperatura de 35 °C.

A seguir, a linha Alba e o peritônio foram suturados com Ácido Poliglicólico PGA Violeta nº 1 (Bioline, Anápolis, Goiás, Brasil), o espaço morto reduzido com Catgut cromado nº 0 (Somerville, Jaboaão dos Guararapes, PE, Brasil) e a pele com Nylon nº 0 (Somerville, Jaboaão dos Guararapes, PE, Brasil). As fêmeas receberam aplicação de anti-inflamatório e antibiótico (Pencivet Plus, Intervet, Cotia, SP, Brasil), além de 50 µg de prostaglandina (Ciosin, Intervet, Cotia, SP, Brasil), para promover a regressão dos corpos lúteos.

O lavado uterino foi colocado em placa de Petri e avaliado em estereomicroscópio binocular (Tecnival/Tecnoglobo, Curitiba, PR, Brasil), onde foram quantificados e analisados segundo a qualidade, de acordo com os padrões da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS, 1999).

2.6 Análise Estatística

Os dados foram expressos na forma de média e erro padrão. Os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva, linearidade, retilinearidade, oscilação, integridade das membranas acrossomal, plasmática e mitocondrial foram analisadas pelo teste de análise de variância (ANOVA), pós-transformação arco seno ($\arcsen \sqrt{P/100}$) dos valores percentuais e teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (INSTAT para Windows, versão 3.01), com nível de significância de $P < 0,05$. Os valores de VCL, VSL, VAP, ALH e BCF foram analisados pelo ANOVA. Para avaliação das taxas de fertilização, utilizou-se o teste do qui-quadrado (χ^2), com nível de significância de $P < 0,05$ (REIS, 2003).

Para avaliar a ultraestrutura dos espermatozoides obtidos de amostras *in natura* e pós-descongelamento utilizou-se a análise descritiva. Para comparação entre os grupos realizou-se a ANOVA, teste de Bartlett para constatar a homogeneidade entre as variâncias e teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer, com nível de significância de $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

A motilidade espermática total após a descongelação foi superior a 30,0% em todos os grupos estudados. Não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos com antioxidantes para os valores de integridade da membrana plasmática, acrossoma e potencial da membrana mitocondrial, avaliadas por sondas fluorescentes (Tabela 1).

A análise da cinética de espermatozoides ovinos pós-descongelação (Tabela 2) não constatou diferença significativa ($P>0,05$) nos parâmetros de MP, LIN, VCL, VSL, VAP, ALH e BCF entre o grupo controle e os tratados. Em contrapartida, a análise da MT evidenciou que a adição de GSH, na concentração de 7 mM, determinou a ocorrência de valores inferiores ($P<0,05$) aos dos grupos Controle, SOD (25 e 100 U/mL) e GSH (5 mM). Todavia, os valores de STR foram maiores ($P<0,05$) no grupo GSH 7 mM do que nos grupos Controle e SOD (25, 50 e 100 U/mL). Para o parâmetro de WOB, a suplementação do diluente com GSH, nas concentrações de 5 e 7 mM, foram maiores ($P<0,05$) do que nos grupos Controle e SOD (25 e 100 U/mL).

A análise ultraestrutural dos espermatozoides ovinos obtidos de amostras de sêmen *in natura* constatou ondulações na membrana plasmática em toda extensão da célula, com preservação da integridade de membrana na maioria destes gametas (Figura 1A). O acrossoma apresentou-se bem preservado, com apenas 6,67% das células com lesão. O núcleo apresentou-se preservado, evidenciando condensação da cromatina. Os cortes longitudinais e transversais da cauda dos espermatozoides evidenciaram perfeita organização mitocondrial e das estruturas das fibras densas externas e axonema (Figura 1B).

Nas amostras de sêmen criopreservado foi possível identificar alterações ultraestruturais tanto na cabeça quanto na cauda dos espermatozoides, em todos os grupos experimentais. Foram constatados edema (Figura 1C) e rupturas na membrana plasmática da região da cabeça espermática, fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática (Figura 1D); perda de membrana plasmática na região da peça intermediária, desorganização estrutural e vacuolização mitocondrial (Figuras 1E e 1F). Entretanto, não foi observada diferença significativa para a estrutura da membrana plasmática entre os grupos experimentais (Tabelas 3 e 4). Para as estruturas do núcleo e axonema não houve diferença significativa entre os grupos (Tabelas 3 e 4).

Maior intensidade de danos espermáticos foi observada nas células espermáticas criopreservadas com GSH, na concentração de 7 mM, tanto no acrossoma quanto nas mitocôndrias, havendo diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupo Controle e demais grupos. O grupo SOD 25 U/mL apresentou menor integridade do acrossoma ($P < 0,05$) do que o grupo Controle. Os grupos suplementados com SOD 50 e 100 U/mL (Figuras 1G e 1H) apresentaram as estruturas do acrossoma e mitocôndrias bem preservados em comparação ao GSH 7 mM.

Na utilização do sêmen *in vivo* (Tabela 5), observou-se que nas fêmeas do grupo Controle foi possível a colheita de 15 estruturas, sendo oito blastocistos Grau I, dois blastocistos Grau II e cinco estruturas não fertilizadas. No grupo de ovelhas inseminadas com sêmen criopreservado com SOD (100 U/mL), foram colhidas 16 estruturas, das quais nove encontravam-se no estágio de blastocisto expandido Grau I, cinco blastocistos Grau I e duas estruturas não fertilizadas. Nas ovelhas inseminadas com sêmen congelado suplementado com GSH 2 mM, 12 estruturas foram colhidas, sendo sete blastocistos Grau I e cinco estruturas não fertilizadas. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais no número de estruturas fertilizadas, bem como na taxa de fertilização.

4 DISCUSSÃO

Os antioxidantes têm ação comprovada na redução do estresse oxidativo na maioria dos tecidos e líquidos orgânicos (BARREIROS et al., 2006). Entretanto, ao avaliar as amostras de sêmen ovino submetidas à congelação em Tris-gema, suplementado com SOD ou GSH, não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros de integridade de membrana plasmática e acrossoma, assim como para potencial de membrana mitocondrial. Estes resultados poderiam indicar que a adição de antioxidantes, nas concentrações utilizadas neste estudo, não influenciou na qualidade de espermatozoides submetidos à criopreservação.

A cinética espermática obtida pela análise computadorizada dos espermatozoides descongelados demonstrou que os parâmetros de velocidade avaliados neste experimento encontram-se abaixo dos relatados na literatura para a espécie ovina. Joshi et al. (2005) trabalharam com sêmen ovino pós-descongelação e observaram velocidades acima de 100 $\mu\text{m/s}$ para os valores de VCL, em amostras diluídas (25 x $10^6/\text{mL}$), o que caracteriza movimento espermático rápido. Segundo Verstegen et al.

(2002), as concentrações espermáticas entre 20 a 50 x 10⁶/mL permitem que o sistema automatizado realize a análise das velocidades sem comprometimento das amostra. Comparando os resultados, a diluição estabelecida para o nosso experimento foi de 50 x 10⁶/mL, o que pode dificultar o trânsito espermático e, conseqüentemente, ter reduzido parcialmente o movimento das células espermáticas.

Segundo Mortimer (2000), existe estreita relação entre VCL, VSL e VAP, indicando que se a amostra possui elevada motilidade progressiva, a VAP e a VSL apresentam valores similares. Neste estudo, observou-se que a MP foi baixa, quando comparada à MT em todos os grupos avaliados, evidenciando que os parâmetros de VAP e VSL não apresentaram valores aproximados, e que as amostras pós-descongelção apresentam redução do movimento retilíneo. Nos parâmetros cinéticos de LIN, STR e WOB, os grupos com maiores porcentuais foram aqueles que apresentaram menores índices de MT, indicando que estas células poderiam estar em processo de criocapacitação, por demonstrarem modificação da cinética compatível com hiperativação (LARSEN et al., 2000).

Sabe-se que a criopreservação de sêmen é responsável por danos funcionais e estruturais aos espermatozoides de diversas espécies (GARNER et al., 1997; CHIRINÉA et al., 2006; PURDY, 2006), principalmente nas regiões do acrossoma e da membrana plasmática que envolve a peça intermediária, visto que nestas áreas há maior concentração de ácidos graxos (LADHA, 1998), o que favorece maior ação tanto das ROS quanto das modificações de temperatura (FARSTAD, 2009). Entretanto, na avaliação ultraestrutural, a adição de SOD em maiores concentrações, assim como GSH 2 e 5 mM, preservaram melhor a estrutura do acrossoma, em comparação aos grupos GSH 7 mM e 25 U/mL de SOD. Estes resultados demonstram que a adição de antioxidantes pode diminuir os danos provocados pelo estresse oriundo da criopreservação. Ainda, pode-se verificar o efeito dose-resposta, uma vez que, ao se aumentar as concentrações de SOD, foram observadas maiores porcentagens de estruturas preservadas; em contrapartida, ao se aumentar a concentração de GSH obteve-se mais danos no acrossoma.

Em trabalhos com sêmen bovino, a adição da GSH ao diluidor varia entre 0,1 a 2,0 mM, uma vez que maiores concentrações deste antioxidante causam danos aos espermatozoides desta espécie, por alterar a osmolaridade celular, fragilizando a membrana plasmática e favorecendo a formação de edema, com conseqüente ruptura das membranas biológicas da célula espermática (BILODEAU et al., 2001). Estes

relatos podem explicar os resultados encontrados neste experimento, uma vez que as concentrações de 2 e 5 mM de GSH não foram deletérias à integridade do espermatozoide, enquanto que a maior concentração testada (7 mM) evidenciou células espermáticas com menor integridade de acrossoma e mitocôndrias, e conseqüente menor motilidade total.

No grupo suplementado com maior concentração de GSH, foram encontradas muitas células espermáticas com vacuolização mitocondrial, ratificando os relatos de Silva et al. (2009a), na congelação de espermatozoides caninos. Tais alterações comprometem a viabilidade espermática por afetarem diretamente a matriz que produz energia à célula espermática. Segundo Pozzan e Rudolf (2009), a mitocôndria absorve o cálcio sob processo eletrogênico e, uma vez danificada ou acionada, não consegue mais captar o cálcio circulante e o espermatozoide perde ou diminui sua motilidade.

Segundo Maxwell e Stojanov (1996), a adição de SOD em elevadas concentrações (800 U/mL) determina melhor proteção à célula espermática ovina submetida à refrigeração, quando comparada a doses inferiores. Entretanto, o sêmen mantido em refrigeração apresenta metabolismo celular apenas reduzido, diferente da congelação, onde sua atividade biológica é interrompida. Por conseguinte, neste experimento optou-se por utilizar doses menores de SOD, uma vez que o tempo de refrigeração usado no procedimento de congelação é muito inferior (3 a 6 horas) àquela utilizada para refrigeração, que podem durar dias em diferentes espécies (SARLÓS et al., 2002; LOPES et al., 2005). Estes resultados podem ser reforçados pelo estudo de César et. al. (2008), que adicionaram 600, 800 e 1000 U/mL de SOD ao diluente de congelação para sêmen caprino e observaram que dosagens elevadas desta enzima apresentaram efeito deletério à célula espermática.

Avaliando as imagens da análise ultraestrutural (MET), observam-se resultados satisfatórios na adição de SOD ao diluente de criopreservação do sêmen ovino, visto que no grupo suplementado com 100 U/mL as estruturas espermáticas apresentavam-se mais bem preservadas, com menos vacuolização nas mitocôndrias, mais acrossomas intactos e manutenção da organização das estruturas celulares, em comparação ao grupo Controle. De acordo com Ferreira e Matsubara (1997), existem dois tipos de SOD, a forma SOD-cobre-zinco que atua no citosol e a SOD-manganês, localizada nas mitocôndrias. Neste estudo, a utilização de SOD-cobre-zinco, nas maiores concentrações, determinou maior porcentual de mitocôndrias íntegras e, conseqüentemente, melhores condições de preservação da capacidade fertilizante do

espermatozoide, podendo ativar o potencial mitocondrial para o contato com o ócito, obtendo melhores índices de fertilidade. Esta preservação da estrutura da mitocôndria pode ter ocorrido por não haver a necessidade de sequestro do SOD-manganês para estabilizar a quantidade de ROS produzida pelo processo de congelação/descongelação da célula espermática.

Os resultados obtidos com a fertilização *in vivo* não evidenciaram diferença significativa entre os grupos avaliados. Todavia, observou-se que o grupo suplementado com SOD (100 U/mL) determinou porcentual numericamente maior em relação aos grupos Controle e GSH. Estes resultados corroboram com todas as avaliações realizadas neste experimento, destacando que a adição de SOD na concentração de 100 U/mL foi eficiente na preservação da integridade espermática, associado ao fato de conferir, numericamente, melhores resultados *in vivo*.

Gillan et al. (2008) observaram que parâmetros *in vitro* de amostras de sêmen bovino apresentam correlação direta com a fertilidade *in vivo*, ressaltando que um único parâmetro não pode ser utilizado para análise espermática, uma vez que ao trabalhar com espermatozoides, o desvio padrão pode ser muito alto. Desta forma, estes autores recomendam a associação de métodos visando predizer com maior confiança a viabilidade dos espermatozoides. Pode-se destacar, ainda, que cada ejaculado possui populações heterogêneas de espermatozoides e que as células podem reagir de forma diferente à adição de substâncias, sendo importante a realização de diversas repetições para obter resultados mais fidedignos.

Desta forma, é possível concluir que a adição de GSH, na concentração de 7 mM, não preserva a integridade de espermatozoides congelados de ovinos, enquanto a adição de SOD 100 U/mL ao diluente Tris-gema, confere proteção às membranas da célula espermática.

5 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante a realização do Doutorado; à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro; e à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA/PB), pela autorização de uso dos reprodutores.

6 REFERÊNCIAS

- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; et al. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 275-286, 2001.
- BRASIL. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea do estado da Paraíba** – Diagnóstico do Município de Campo de Santana, 20 p., 2005.
- CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; DAL BOSCO, A.; et al. Effect of supranutritional level of dietary α -tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 1723-1732, 2002.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2ª Ed., Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.
- CÉSAR, C.N.R.; VIDAL, A.H.; CAJUEIRO, J.F.P.; et al. Adição de antioxidantes enzimáticos na viabilidade *in vitro* do sêmen criopreservado de caprinos criados no agreste paraibano. In: CONERA – Congresso Norte/Nordeste de Reprodução Animal, 4, 2008, Imperatriz-MA. **Anais...**, Imperatriz-MA, 2008. (CD-ROM).
- CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M; SOUZA, F.F; et al. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 407-415, 2006.
- COLETO, Z.F.; GUERRA M.M.P.; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 101-104, 2002.
- FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen – New Challenges. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 336-341, 2009.
- FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Assistência Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- GARDÓN, J. C.; RODRIQUEZ, J. A.; GADEA, J. Addition of reduced glutathione to thawing medium improved the sperm motility and reduced ROS generation in frozen ovine and caprine spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 2 p. 155, 2003.
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.

- GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M.C.; et al. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 201-204, 2008.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.H.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p 187-195, 2004.
- GUTHRIE, H.D.; WELCH G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2089-2100, 2006.
- JOSHI, A.; BAG, S.; NAQVI, S.M.K.; et al. Effect of post-thawing incubation on sperm motility and acrossomal integrity of cryopreserved Garole ram semen. **Small Ruminant Research**, v. 56, p. 231-238, 2005.
- IETS – **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. International Embryo Transfer Society. 3. ed. São Paulo: SBTE, 1999. 180 p.
- LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v. 165, p. 1-10, 1998.
- LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. A positive role of superoxide anions triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 21- 25, 1993.
- LARSEN, L.; SCHEIKE, T.; JENSEN, T.K.; et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. **Human Reproduction**, v. 15, n. 7, p. 1562-1567, 2000.
- LOPES, B.V.; CUNHA, I.C.N.; PAPA, F.O.; et al. Estudo da viabilidade de um novo diluidor para a refrigeração do sêmen canino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 3/4, p. 174-178, 2005.
- MAXWELL, W.M.C; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 1013-1020, 1996.
- MORTIMER, S.T. CASA – Practical Aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- POZZAN, T.; RUDOLF, R. Measurements of mitochondrial calcium in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1787, p. 1317-1323, 2009.
- REIS, J.C. **Estatística aplicada à pesquisa em Ciência Veterinária**. Olinda: Luci Artes Gráficas Ltda, 2003. 651 p.

ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, J.L.; et al. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*).

Biology of Reproduction, v. 58, p. 475-482, 1998.

SARAIVA, K.L.A.; SILVA, A.K.S.E.; WANDERLEY, M.I.; et al. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. **International Journal of**

Experimental Pathology, v. 90, p. 454-462, 2009.

SARLÓS, P.; MOLNAR, A.; KOKAI, M.; et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 2, p. 235-245, 2002.

SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; et al. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 595-601, 2009a.

SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; et al. Criopreservação de sêmen ovino em diferentes estações climáticas: interferência da sazonalidade. In: SINCORTE - Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 4, 2009, João Pessoa-PB. **Anais...**, João Pessoa-PB, 2009b. (CD-ROM).

SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K.; et al. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 237-243, 1996.

SOARES, A.T.; SILVA, S.V.; LEMOS, P.F.B.A.; et al. Atividade mitocondrial, integridade de membrana plasmática e motilidade de espermatozoides caprino submetidos à criopreservação em meio adicionado de glutathione reduzida. In: SINCORTE - Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 4, 2009, João Pessoa-PB. **Anais...**, João Pessoa-PB, 2009. (CD-ROM).

STEFANOV, R.; ANGELOVA, M.; STEFANOVA, T.; et al. Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea 103* improves ram spermatozoa functions *in vitro*. **Andrologia**, v. 36, p. 51-56, 2004.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 482-492, 2000.

Tabela 1. Porcentual (\pm erro padrão) de espermatozoides ovinos da raça Santa Inês criopreservados em Tris-gema suplementado com SOD e GSH com integridade da membrana plasmática, acrossoma e alto potencial da membrana mitocondrial

Grupos	iAc (%)	iMP (%)	aPMM (%)
Controle	29,50 \pm 7,42	35,06 \pm 3,87	66,69 \pm 6,86
SOD 25 U/mL	26,44 \pm 5,13	30,06 \pm 4,47	61,06 \pm 6,28
SOD 50 U/mL	27,31 \pm 7,68	36,31 \pm 4,06	62,31 \pm 8,43
SOD 100 U/mL	33,50 \pm 7,85	39,44 \pm 4,60	59,81 \pm 7,10
GSH 2 mM	20,56 \pm 5,03	32,19 \pm 3,55	67,88 \pm 7,55
GSH 5 mM	22,81 \pm 5,06	29,00 \pm 2,98	57,06 \pm 6,99
GSH 7 mM	22,31 \pm 5,60	29,88 \pm 3,37	67,06 \pm 8,03

iAc= integridade de acrossoma; iMP= integridade de membrana plasmática; aPMM= alto potencial de membrana mitocondrial.

Tabela 2. Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros cinéticos de espermatozoides de ovinos da raça Santa Inês submetidos à congelação em Tris-gema acrescido dos antioxidantes SOD e GSH

Grupos	MT	MP	LIN	STR	WOB	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	($\mu\text{m/s}$)	($\mu\text{m/s}$)	($\mu\text{m/s}$)	(μm)	(Hz)
Controle	69,01 \pm 1,97 ^a	7,23 \pm 1,91	41,28 \pm 1,02	62,68 \pm 0,86 ^b	65,64 \pm 0,80 ^b	51,69 \pm 3,77	21,41 \pm 1,83	33,96 \pm 1,83	3,18 \pm 0,13	6,73 \pm 0,26
SOD 25 U/mL	71,01 \pm 3,65 ^a	11,33 \pm 1,51	48,98 \pm 2,21	66,24 \pm 1,63 ^b	67,81 \pm 1,39 ^b	63,50 \pm 2,87	28,90 \pm 2,53	43,13 \pm 2,53	3,39 \pm 0,13	7,24 \pm 0,29
SOD 50 U/mL	49,95 \pm 4,15 ^{ab}	7,26 \pm 2,06	46,18 \pm 1,59	67,29 \pm 1,50 ^b	68,21 \pm 1,02 ^{ab}	51,49 \pm 4,30	24,40 \pm 3,32	35,54 \pm 3,32	3,15 \pm 0,08	7,16 \pm 0,40
SOD 100 U/mL	58,43 \pm 4,72 ^a	9,41 \pm 1,94	45,54 \pm 2,00	66,34 \pm 1,85 ^b	67,35 \pm 1,37 ^b	62,75 \pm 6,57	28,73 \pm 4,01	42,24 \pm 4,01	3,50 \pm 0,12	7,35 \pm 0,25
GSH 2 mM	49,45 \pm 5,79 ^{ab}	9,19 \pm 2,50	47,25 \pm 1,74	68,56 \pm 1,51 ^{ab}	68,45 \pm 1,21 ^{ab}	59,31 \pm 7,42	28,04 \pm 3,91	40,55 \pm 3,91	3,33 \pm 0,12	6,96 \pm 0,53
GSH 5 mM	55,45 \pm 4,68 ^a	10,26 \pm 2,21	48,29 \pm 1,59	68,85 \pm 1,51 ^{ab}	69,74 \pm 1,05 ^a	59,94 \pm 5,26	29,31 \pm 3,60	42,06 \pm 3,60	3,30 \pm 0,06	7,54 \pm 0,16
GSH 7 mM	42,38 \pm 4,90 ^b	9,88 \pm 2,98	49,73 \pm 1,35	70,11 \pm 1,27 ^a	70,73 \pm 0,92 ^a	57,14 \pm 6,87	28,94 \pm 4,18	40,74 \pm 5,30	3,13 \pm 0,09	7,28 \pm 0,28

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos. MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; LIN= linearidade; STR= retilinearidade; WOB= oscilação; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade em linha reta; VAP= velocidade média do percurso; ALH= amplitude do deslocamento lateral da cabeça espermática; BCF= batimento flagelar cruzado.

Tabela 3. Porcentual (média \pm erro padrão) de estruturas preservadas na cabeça de espermatozoides ovinos *in natura* ou congelados em Tris-gema, suplementado com SOD e GSH, avaliado pela microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Grupos	Acrossoma	Membrana	Núcleo
	(%)	Plasmática (%)	(%)
<i>In natura</i>	93,33 \pm 6,67 ^a	63,33 \pm 6,15	100,00 \pm 0,00
Controle	56,67 \pm 6,15 ^b	63,33 \pm 3,33	100,00 \pm 0,00
SOD 25 U/mL	50,00 \pm 4,47 ^c	60,00 \pm 5,16	100,00 \pm 0,00
SOD 50 U/mL	60,00 \pm 7,30 ^{ab}	63,33 \pm 6,15	100,00 \pm 0,00
SOD 100 U/mL	63,33 \pm 6,15 ^a	70,00 \pm 6,83	100,00 \pm 0,00
GSH 2 mM	66,67 \pm 9,89 ^a	70,00 \pm 4,47	100,00 \pm 0,00
GSH 5 mM	66,67 \pm 4,22 ^a	66,67 \pm 8,43	96,67 \pm 3,33
GSH 7 mM	46,67 \pm 6,67 ^c	56,67 \pm 3,33	96,67 \pm 3,33

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

Tabela 4. Porcentual (média \pm erro padrão) de estruturas preservadas na cauda de espermatozoides ovinos *in natura* ou congelado em Tris-gema, suplementado com SOD e GSH em diferentes concentrações, avaliado pela microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Grupos	Mitocôndrias	Membrana	Axonema
	(%)	Plasmática (%)	(%)
<i>In natura</i>	96,67 \pm 3,33 ^a	76,67 \pm 6,15	100,00 \pm 0,00
Controle	56,67 \pm 9,55 ^b	60,00 \pm 10,33	100,00 \pm 0,00
SOD 25 U/mL	70,00 \pm 4,47 ^{ab}	70,00 \pm 8,56	100,00 \pm 0,00
SOD 50 U/mL	70,00 \pm 4,47 ^{ab}	63,33 \pm 6,15	100,00 \pm 0,00
SOD 100 U/mL	76,67 \pm 6,15 ^{ab}	80,00 \pm 7,30	100,00 \pm 0,00
GSH 2 mM	66,67 \pm 4,22 ^{ab}	56,67 \pm 3,33	100,00 \pm 0,00
GSH 5 mM	66,67 \pm 8,43 ^{ab}	53,33 \pm 4,22	100,00 \pm 0,00
GSH 7 mM	43,33 \pm 8,03 ^c	70,00 \pm 6,83	100,00 \pm 0,00

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

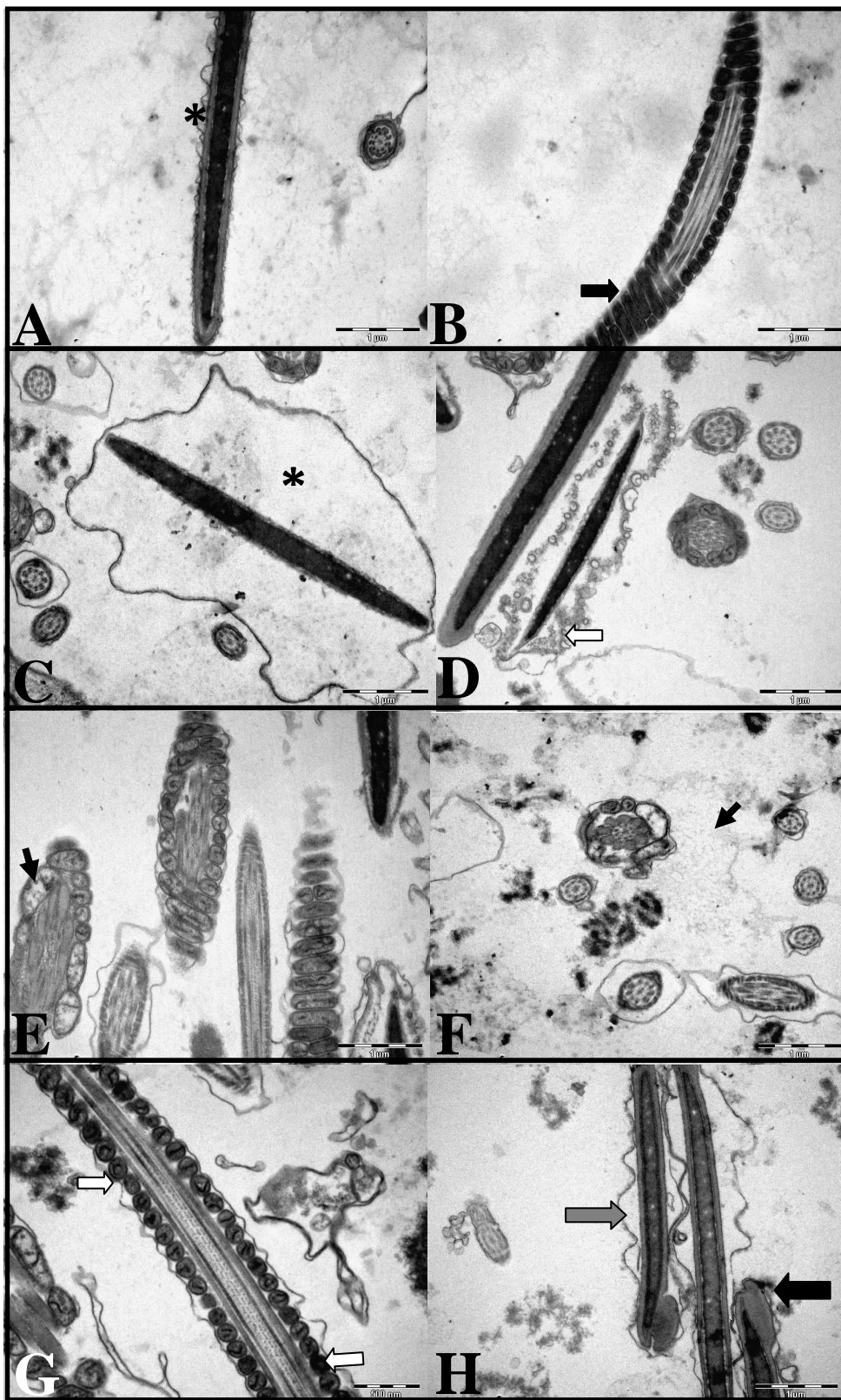


Figura 1. Ultraestrutura de espermatozoides de reprodutores ovinos obtidos de sêmen *in natura* (A e B) e criopreservado (C, D, E, F, G e H) em diluente à base de leite desnatado e glicerol 5%. A – Corte longitudinal da cabeça mostrando membrana plasmática íntegra, com discreta ondulação (*); acrossoma íntegro; B – Corte longitudinal da peça intermediária evidenciando preservação das mitocôndrias (seta preta); C – Grupo GSH 7 mM: corte longitudinal da cabeça mostrando edema na membrana plasmática (*); D – Grupo Controle: corte longitudinal da cabeça apresentando vesiculação das membranas plasmática e acrossomal externa (seta branca); E – Grupo GSH 7 mM: corte transversal da cauda evidenciando vacuolização das mitocôndrias (seta preta); F – Grupo SOD 25 U/mL: corte transversal da cauda mostrando vacuolização das mitocôndrias (seta preta); G – Grupo SOD 100 U/mL: corte longitudinal da peça intermediária mostrando mitocôndrias íntegras (setas brancas); H – Grupo SOD 100 U/mL: corte longitudinal da cabeça evidenciando acrossoma (seta preta) e membranas plasmáticas intactos (seta cinza).

Tabela 5. Número de estruturas colhidas e taxa de fertilização de ovelhas inseminadas com sêmen criopreservado em diluente à base de Tris-gema suplementado com SOD e GSH

Grupos	Estruturas colhidas			Taxa de Fertilização (%)
	Fertilizadas n	Não fertilizadas n	Total n	
Controle	10	05	15	66,67
SOD 100 U/mL	14	02	16	87,50
GSH 2 mM	07	05	12	58,34
Total	31	12	43	72,09

4.2 Efeito da adição de antioxidantes ao diluidor Tris-gema na viabilidade de espermatozoides congelados de ovino

Effect of antioxidant addition in the Tris egg-yolk extender on the viability of thawed ram sperm

Sildivane Valcácia Silva¹, Adriana Trindade Soares^{1,2}, André Mariano Batista^{1,3}, Felipe Costa Almeida¹, José Ferreira Nunes⁴, Christina Alves Peixoto⁵, Maria Madalena Pessoa Guerra^{1*}

¹Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE
Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n. Dois Irmãos, Recife – PE. CEP: 52171-900

²Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – EMEPA, João Pessoa, PB

³Curso de Doutorado da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO;

⁴Laboratório de Tecnologia do Sêmen, UECE, Fortaleza, CE

⁵Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) – Recife, PE;

*E-mail: mpguerra@dmv.ufrpe.br

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar *in vitro* o efeito da adição de Catalase (CAT), Vitamina E (Trolox) e a associação de CAT e supéroxido dismutase (SOD) ao diluente de congelamento do sêmen ovino. Foram utilizados cinco reprodutores ovinos da raça Santa Inês, com histórico de fertilidade, sendo os ejaculados obtidos pelo método de vagina artificial. Os ejaculados, após avaliação foram submetidos à formação do *pool*, diluído em Tris-gema (5% glicerol), acrescido de antioxidantes, de acordo com os grupos experimentais (G1= grupo Controle; G2= 30 µM de Trolox; G3= 60 µM de Trolox; G4= 120 µM de Trolox; G5= 25 U/mL de CAT; G6= 50 U/mL de CAT; G7= 100 U/mL de CAT; G8= 25 U/mL de CAT + 100 U/mL de SOD), na concentração final de 240 x 10⁶ spz/mL. O sêmen foi acondicionado em palhetas (0,25 mL), submetido à criopreservação utilizando sistema automatizado e armazenado em nitrogênio líquido (-196 °C). Após descongelamento (37 °C/30 segundos), as amostras foram submetidas a análise de integridade das membranas plasmática (iMP) e acrossomal (iAc), potencial de membrana mitocondrial (PMM), cinética e ultraestrutura dos espermatozoides. O grupo CAT 100 U/mL apresentou menor porcentual (P<0,05) de espermatozoides com acrossoma íntegros. Diferenças significativas (P<0,05) foram observadas entre grupos na cinética espermática (motilidade progressiva, linearidade, retilinearidade, índice de oscilação, velocidade em linha reta e velocidade média do percurso) sendo superiores para os grupos Trolox 30 e 60 µM e inferiores para os grupos CAT 50 e 100 U/mL. Na avaliação ultraestrutural, os grupos CAT 50 e 100 U/mL apresentaram menor preservação (P<0,05) do acrossoma, o CAT 25 U/mL foi superior (P<0,05) ao CAT 100U/mL para a preservação da membrana plasmática. Com base nos resultados de integridade do acrossoma, cinética e ultraestrutura, é possível concluir que a adição de CAT 50 e 100 U/mL ao diluente Tris-gema não preserva a viabilidade de espermatozoides ovinos congelados, enquanto que a adição de Trolox, nas concentrações de 60 e 120 µM, proporcionam maior integridade estrutural aos espermatozoides ovinos criopreservados.

Palavras-chaves: antioxidantes, acrossoma, ultraestrutural.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate *in vitro* the effect of adding catalase (CAT), vitamin E (Trolox) and the association of CAT to superoxide dismutase (SOD) to ram semen freezing extender. It was used five Santa Inês ram, with history of fertility, and ejaculates were obtained by artificial vagina. The *pool* of semen samples were diluted in Tris egg-yolk (5% glycerol) plus antioxidants, according to experimental groups (G1 = control group, G2 = 30 μ M of Trolox, G3 = 60 μ M of Trolox, G4 = 120 μ M of Trolox, G5 = 25 U/mL CAT, G6 = 50 U/mL CAT; G7 = 100 U/mL CAT; G8 = 100 U/mL SOD + 25 U/mL CAT), with final concentration of 240×10^6 spz/mL. Semen was stored in straws (0.25 mL) and subjected to cryopreservation using an automated system, then stored in liquid nitrogen (-196 °C). After thawing (37 °C/30 seconds), samples were subjected to analysis of plasma membrane integrity (iMP) and acrosomal (iAC), mitochondrial membrane potential (MMP), kinematics and ultrastructure of spermatozoa. CAT 100 U/mL showed a lower percentage ($P < 0.05$) of spermatozoa with intact acrosome. Significant differences ($P < 0.05$) were observed between groups on the kinematics sperm (progressive motility, linearity, straightness, wobble, straight line velocity and average path velocity) were superior to groups 30 and 60 μ M Trolox and lower for groups CAT 50 and 100 U/mL. On ultrastructural evaluation, CAT 50 and 100 U/mL groups had lower preservation ($P < 0.05$) for acrosome, CAT 25 U/mL was higher ($P < 0.05$), CAT 100 U/ml for the preservation of plasma membrane and SOD 25 U/mL was lower ($P < 0.05$) than other groups in the preservation of mitochondria. Based on the results of acrosome integrity, ultrastructure and kinematics, we conclude that addition of CAT 50 and 100 U/mL with Tris egg- yolk extender does not preserve the viability of ram sperm frozen, while the addition of Trolox at concentrations 60 and 120 μ M, provide better structural integrity to ram cryopreserved spermatozoa.

Keywords: antioxidants, acrosome, ultrastructural.

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação de espermatozoides mamíferos é um processo complexo que envolve o equilíbrio de muitos fatores para se obter resultados satisfatórios (PURDY, 2006). É de fundamental importância que as membranas biológicas sejam preservadas durante os estresses químico e físico, ocasionados pelas modificações promovidas pelo processo de criopreservação (GUERRA et al., 2004), como por exemplo, a diluição do sêmen (MORTIMER e MAXWELL, 2004), a potencial toxicidade dos crioprotetores penetrantes dependendo de sua concentração (HOLT, 2000) e a redução de temperatura inerente ao processo (WATSON, 2000).

A congelação confere redução na viabilidade espermática, uma vez que causa danos às membranas do espermatozoide, o que determina redução da capacidade fertilizante do espermatozoide submetido ao processo de congelação/descongelação nas espécies canina (SILVA et al., 2009a), bovina (BILODEAU et al., 2000), caprina (ABOAGLA e TERADA, 2004; HASHIDA et al., 2005), suína (KUMAR et al., 2003) e ovina (MOURA et al., 1995). Sabe-se, entretanto, que os danos causados pela criopreservação podem ser provenientes da ação de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Dentre as ROS, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é responsável pela depleção do ATP espermático, com conseqüente redução na motilidade, lesões nas membranas espermáticas e cromatina, assim como peroxidação lipídica (SHARMA e AGARWAL, 1996).

Em contrapartida, estudos demonstram que antioxidantes naturais presentes no plasma seminal exercem efeito protetor sobre a membrana plasmática dos espermatozoides, preservando tanto a atividade metabólica quanto a função celular (O'FLAHERTY et al., 1997). Estes removedores de ROS podem ter ação enzimática, como CAT, SOD, glutatona redutase, glutatona peroxidase, e ação não-enzimática, como a vitamina E, glutatona reduzida (GSH), cisteína, entre outros (GUERRA et al., 2004). Entretanto, como a diluição do ejaculado para criopreservação reduz bastante a proporção dos antioxidantes presentes no plasma seminal, em relação ao volume inicial, a adição destas substâncias ao diluidor pode ser uma alternativa para preservar os parâmetros espermáticos após o processo de congelação/descongelação (SOARES e GUERRA, 2009).

Segundo Breininger et al. (2005), a adição de α -tocoferol ao meio de congelação de sêmen suíno preveniu danos oxidativos à célula espermática e conseqüentemente favoreceu a motilidade espermática. Entretanto, a adição deste antioxidante em diluidores para refrigeração de sêmen ovino não interferiram na preservação dos espermatozoides (SARLÓS et al., 2002). Baumber et al. (2003) acrescentaram a CAT ao diluidor para sêmen equino, observaram menos danos no DNA espermático dos grupos tratados com o antioxidante, enquanto De Graaf et al. (2007) não obtiveram resultados satisfatórios após adição de CAT ao diluidor de sêmen ovino para sexagem espermática. Sabe-se que a CAT atua no organismo em conjunto com a SOD, que catalisa a dismutação do O_2^- em O_2 e H_2O_2 , participando de um importante sistema antioxidante nas células expostas ao oxigênio (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

Como as pesquisas realizadas sobre a adição de antioxidantes na criopreservação espermática apresentam resultados contraditórios, objetivou-se com este estudo avaliar os efeitos da suplementação do diluidor Tris-gema com os antioxidantes Trolox, CAT e associação de CAT e SOD na viabilidade de espermatozoides criopreservados de ovinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e Período do Experimento

O experimento foi realizado na Estação Experimental Benjamin Maranhão, localizada no município de Tacima, região de clima tropical semiárido (06°29'18" de latitude sul e 35°38'14" de longitude oeste), altitude de 168 metros e precipitação média anual de 431,8 mm³ (BRASIL, 2005). As colheitas e criopreservação do sêmen foram realizadas no período de julho de 2009, segundo estudos prévios que determinaram melhor qualidade espermática na época chuvosa (SILVA et al., 2009c).

2.2 Animais e Colheita de Sêmen

Foram utilizados cinco reprodutores, sexualmente maduros e com histórico de fertilidade. Os ejaculados foram obtidos pelo método de vagina artificial, com o uso de uma fêmea em estro como manequim. As colheitas foram realizadas em dias alternados, sendo realizadas seis repetições por macho, totalizando 30 ejaculados.

2.3 Análise e Criopreservação do Sêmen

Inicialmente, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto aos parâmetros de turbilhonamento, motilidade e vigor em microscópio de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com a colocação de 10 µL em lâmina previamente aquecida (37 °C) para turbilhonamento e deposição de lamínula 20x20 sobre a gota para avaliação de motilidade e vigor. A concentração espermática foi obtida em câmara de Neubauer, na diluição de 1:200, em formol salino. Para análise da morfologia espermática, utilizou-se o método de câmara úmida (CBRA, 1998).

O sêmen de cada reprodutor foi avaliado separadamente, segundo o CBRA (1998) e, quando aprovados (turbilhonamento ≥ 3 ; motilidade $\geq 70\%$; vigor ≥ 3 ; concentração espermática $\geq 1,0 \times 10^9$ /mL e patologias espermáticas $\leq 20\%$), submetidos à formação do *pool*. Em seguida, o *pool* foi diluído em meio de

criopreservação Tris-gema (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488 g de frutose; 100 mL de água ultrapura; 20% de gema de ovo, 5% de glicerol, pH 7,2), acrescido de antioxidantes, de acordo com os grupos experimentais [G1= grupo Controle, diluente sem adição de antioxidantes; G2= 30 μ M de Trolox (Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA); G3= 60 μ M de Trolox; G4= 120 μ M de Trolox; G5= 25 U/mL de CAT (Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA); G6= 50 U/mL de CAT; G7= 100 U/mL de CAT; e G8= 25 U/mL de CAT + 100 U/mL de SOD (Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA)], na concentração final de 240×10^6 espermatozoides/mL.

A seguir, o sêmen foi acondicionado em palhetas (0,25 mL) e congelado utilizando o sistema automatizado (TK-3000[®], TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, Brasil), na curva de refrigeração de -0,25 °C/minuto, iniciada a 28 °C, temperatura ambiente. Após alcançar temperatura de 5 °C, os grupos foram submetidos ao tempo de estabilização, com duração de 120 minutos. A curva de congelamento foi procedida imediatamente após o período de estabilização, com redução de -15 °C/minuto, até alcançar -120 °C. Em seguida, as palhetas foram imersas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

2.4 Descongelamento e Análises Espermáticas

As amostras de sêmen criopreservadas foram descongeladas (37 °C por 30 segundos) após 30 dias de armazenamento e submetidas à análise de integridade de membrana plasmática e acrossoma, função mitocondrial, cinética e ultraestrutura dos espermatozoides.

Integridade de membrana plasmática

Para esta avaliação, utilizou-se o método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA) e Iodeto de Propídeo (IP; Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA), modificado por Coletto et al. (2002). Alíquotas de 50 μ L de sêmen foram diluídas em 150 μ L de Tris (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488 g de frutose, 100 mL de água bidestilada; pH 6,8), contendo 5 μ L de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 μ L de IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos a 37 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com aumento de 400x, usando filtro de emissão

DBP 580-630 nm e excitação DBP 485-520 nm, e classificado com membrana intacta, quando se apresentava corado em verde, e com membrana danificada, quando corado em vermelho.

Integridade do acrossoma

Para determinar este parâmetro, os espermatozoides foram corados com Isotiocianato de Fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA), de acordo com técnica descrita por Roth et al. (1998). Alíquotas de 5 µL de sêmen foram preparadas para esfregaço e secadas ao ar. Uma alíquota de 100 µL da solução estoque de FITC-PNA (1 mg/mL) foi descongelada e adicionada a 900 µL de PBS para obter a concentração final de 100 µg/mL. Alíquotas (10-20 µL) desta solução foram colocadas sobre lâminas, as quais foram incubadas por 15 minutos em câmara úmida a 4 °C, na ausência de luz. Após incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS refrigerado (4 °C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 µL de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de p-phenylenediamine) foi colocado sobre a lâmina e coberto com lamínula.

Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x sob óleo de imersão em microscopia de epifluorescência, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os gametas foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentavam a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou acrossomas reagidos, quando apresentavam faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda cabeça da célula.

Função mitocondrial

A função mitocondrial dos espermatozoides foi determinada pela utilização do fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE e WELCH, 2006). Alíquotas de 50 µL de sêmen foram diluídas em 150 µL de Tris contendo 5 µL de JC-1 (0,15 mM em DMSO), incubadas por 10 minutos a 38 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de Glutaraldeído. Duzentos espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência, com aumento de 1000x sob óleo de imersão, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. As células que apresentavam a peça intermediária corada em laranja foram classificadas com alto potencial de

membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

Cinética espermática

Duas palhetas de cada grupo foram descongeladas em banho-maria, na temperatura de 37 °C, por trinta segundos. As amostras de sêmen foram inicialmente diluídas em solução fisiológica (0,9% NaCl), com o objetivo de reduzir a concentração espermática (50 milhões de espermatozoides/mL) e a densidade do diluidor à base de gema, e facilitar a captação das imagens, evitando sobreposição das células espermáticas, segundo Mortimer (2000). A análise foi realizada utilizando-se a Câmara de Makler[®] (Sefi Medical Instrument, Haifa, Israel), com capacidade para 10 µL, previamente aquecida a 37 °C. A câmara foi colocada no microscópio de contraste de fase (Nikon[™] H5505, Eclipse 50i, Japão) e as imagens capturadas por uma vídeo-câmera (Basler Vision Technologie[™] A312FC, Ahrensburg, Alemanha).

Pelo sistema CASA (Sperm Class Analyzer – SCA[™], Microoptics, S.L., Version 3.2.0, Barcelona, Espanha) os seguintes parâmetros foram avaliados: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e oscilação (WOB), sendo estes expressos em porcentagem; velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média do percurso (VAP), expressos em micrômetros por segundos; amplitude do descolamento lateral da cabeça espermática (ALH), expresso em micrômetros e a frequência do batimento flagelar cruzado (BCF), expressa em Hertz.

Análise ultraestrutural

A análise da ultraestrutura espermática foi realizada através da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Amostras de sêmen *in natura* e pós-congelação foram lavadas três vezes (600 g x 5 minutos) em tampão Cacodilato de Sódio a 0,1 M (pH 7,2), e fixadas *overnight* em solução contendo Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 2,5% e tampão Cacodilato de Sódio. Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas numa solução contendo 1% de Tetróxido de Ósmio, 2 mM CaCl₂ e 0,8% de Ferricianeto de Potássio em tampão Cacodilato 0,1 M (pH 7,2). A seguir, as amostras de sêmen foram desidratadas em série crescentes de acetona, infiltradas e emblocadas em resina SPIN-PON (Embed 812 – Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA). A polimerização foi feita a 60 °C por 72

horas. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo, colocados em grades de níquel de 300-mesh, contrastados com 5% de Acetato de Uranila e Citrato de Chumbo (SARAIVA et al., 2009). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgani 268D (FEI Company, Eindhoven, Holanda).

Primeiramente realizou-se a avaliação descritiva das estruturas do espermatozoide, considerando a interpretação qualitativa da técnica. Para a análise quantitativa da célula espermática e comparação entre grupos, foram contadas 60 estruturas por cada grupo, sendo divididas entre cabeça e cauda. Na região da cabeça espermática foram avaliadas as estruturas do acrossoma, membrana plasmática e núcleo. Na região da cauda, analisou-se mitocôndria, membrana plasmática e axonema.

2.5 Análises Estatísticas

Os dados foram expressos na forma de média e erro padrão. Os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva, linearidade, retilinearidade, oscilação, integridade das membranas acrossomal, plasmática e mitocondrial foram analisadas pelo teste de análise de variância (ANOVA), pós-transformação arco seno ($\arcsen \sqrt{P/100}$) dos valores percentuais e teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (INSTAT para Windows, versão 3.01), com nível de significância de $P < 0,05$. Os valores de VCL, VSL, VAP, ALH e BCF foram analisados pelo ANOVA.

Para avaliar a ultraestrutura dos espermatozoides obtidos de amostras *in natura* e pós-descongelamento utilizou-se a análise descritiva. Para comparação entre os grupos realizou-se a ANOVA, teste de Bartlett para constatar a homogeneidade entre as variâncias e teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer, com nível de significância de $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

Não foi observada diferença significativa entre os grupos suplementados com antioxidantes e o grupo Controle para os parâmetros de integridade da membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial (Tabela 1). Entretanto, a integridade do acrossoma das amostras do CAT 100 U/mL foi inferior ($P < 0,05$) ao grupo Controle e aos demais grupos avaliados.

Não foi constatada diferença significativa entre grupos para os parâmetros de MT, VCL, ALH e BCF (Tabela 2). Nos parâmetros de MP e VSL, as amostras de sêmen congeladas com Tris-gema dos grupos Controle, CAT 50 e 100 U/mL apresentaram menores resultados ($P<0,05$) do que as amostras de Trolox 60 e 120 μ M e CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL. Na análise de LIN, WOB e VAP, as amostras dos grupos Controle, CAT 50 e 100 U/mL apresentaram menores resultados ($P<0,05$) do que aqueles dos grupos Trolox 60 e 120 μ M. Na avaliação da STR, os resultados dos grupos Trolox 60 e 120 μ M ($P<0,05$) foram superiores aos demais grupos.

As amostras de sêmen *in natura* evidenciaram membranas plasmáticas íntegras, com pequenas ondulações em toda extensão celular. O acrossoma apresentou-se intacto, sendo visibilizadas a preservação das membranas acrossomais externa e interna, caracterizada pela observação do *perforatorium* (Figura 1A). Aos cortes longitudinais e transversais da cauda dos espermatozoides foram observadas perfeitas organizações mitocondriais e disposição do par de centríolos central, respectivamente. As mitocôndrias estavam preservadas, em formato esférico e com ausência de vacuolização (Figura 1B).

Na avaliação do sêmen pós-criopreservação, células visibilizadas apresentaram acrossoma lesado, algumas com característica de reação acrossomal, evidenciadas pela presença de vesiculações (Figura 1C), consequência da fusão de membranas plasmática e acrossomal externa, visibilização da zona equatorial (Figura 1D) exposição do envelope nuclear, caracterizando perda total de acrossoma, independente do grupo avaliado. Nos grupos tratados com antioxidantes foi constatado o efeito dose-dependente (Tabelas 3 e 4). Ao elevar a concentração da Catalase, a estrutura acrossomal apresentou-se menos preservadas (Figura 1E e 1F), diferente do observado nos grupos suplementados com Trolox, que ao aumentar a concentração deste antioxidante ao diluente de congelamento, observou-se maior preservação do acrossoma. No grupo CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL observou-se melhor preservação ($P<0,05$) do acrossoma, em comparação aos CAT 50 e 100 U/mL.

Na avaliação quantitativa da membrana plasmática (Tabela 3) localizada na cabeça do espermatozoide, amostras do grupo CAT 25 U/mL apresentaram maior porcentual ($P<0,05$) de gametas com preservação desta estrutura em comparação ao grupo CAT 100 U/mL, não diferindo dos demais grupos. Em contrapartida, na avaliação da membrana plasmática que envolve a cauda espermática (Tabela 4), não foi observada diferença significativa entre as amostras pós-criopreservação,

independente do grupo. Na avaliação qualitativa, foram observados danos nesta estrutura, sendo as extremidades rompidas visibilizadas em espirais, principalmente na membrana que reveste a cabeça espermática, em comparação à membrana plasmática localizada na cauda espermática.

Pós-criopreservação, as células analisadas apresentaram lesões como a vacuolização e desorganização do formato em hélice da matriz mitocondrial (Figura 1G), apresentando diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupo Controle e o sêmen *in natura* (Tabela 4). Nos grupos tratados com os antioxidantes, entretanto, foi observado que as mitocôndrias sofreram menores danos (Figuras 1F e 1H), apresentando-se mais íntegras, não sendo constatada diferença significativa entre o sêmen *in natura* e os grupos suplementados com CAT (25, 50 e 100 U/mL), Trolox (60 e 120 μM) e associação CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL, enquanto a menor concentração de Trolox (30 μM) apresentou-se inferior na proteção das mitocôndrias espermáticas ($P < 0,05$).

O núcleo (Tabela 3) e o axonema (Tabela 4) não apresentaram diferença significativa entre as amostras de sêmen dos grupos suplementados com antioxidantes e o grupo Controle.

4 DISCUSSÃO

A ação benéfica dos antioxidantes é amplamente relatada na literatura. A inclusão da vitamina E na alimentação de humanos (KESKES-AMMAR et al., 2003), coelhos (YOUSEF et al., 2003), galos (DANIKOWSKI et al., 2002) e suínos (AUDET et al., 2004) melhora os parâmetros reprodutivos em comparação aos que não receberam este antioxidante na alimentação. Entretanto, a adição de antioxidantes ao diluente no processo de criopreservação da célula espermática apresenta resultados variados.

Nos achados deste experimento foi observado que a adição de Trolox, nas concentrações de 60 e 120 μM , foi eficiente na preservação da célula espermática após a congelamento. Tais afirmações podem ser evidenciadas pelos resultados encontrados nos parâmetros cinéticos e na avaliação ultraestrutural. Estes resultados são fundamentados pelos estudos que indicam que a vitamina E tem efeito protetor sobre a membrana plasmática dos espermatozoides (CEROLINI et al., 2000).

No processo de refrigeração de sêmen, a adição de 10 mM da vitamina E não apresentou benefícios às membranas do espermatozoide ovino (UPRETI et al., 1997), enquanto que no diluente de congelação do sêmen suíno, este antioxidante na concentração de 200 µg/mL mostrou-se eficaz, aumentando os valores de motilidade espermática (BREININGER et al., 2005). Estes relatos sobre a adição de 120 µM/mL de Trolox aos diluentes de congelação também foram verificados por Silva et al. (2009b), em espermatozoides equinos, que identificaram melhora nos parâmetros de motilidade total e progressiva.

Peña et al. (2003) relataram que a adição do acetato de α -tocoferol (análogo da vitamina E), nas concentrações de 100 a 200 µM, ao meio de congelação do sêmen suíno favoreceu os parâmetros de motilidade e o potencial de membrana mitocondrial. Neste experimento, não foi evidenciada interferência deste antioxidante sobre o PMM. Entretanto, todos os grupos analisados apresentaram mais de 60% dos espermatozoides com alto PMM. Em relação à motilidade, maior porcentual de gametas com motilidade progressiva foi observado nas amostras suplementadas com Trolox, nas concentrações de 60 e 120 µM.

Os resultados obtidos neste experimento se devem ao fato do efeito benéfico da vitamina E, relacionado à sua função biológica, que atua impedindo a peroxidação lipídica nas membranas biológicas (SARLÓS et al., 2002). A lipoperoxidação é definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, determinando destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, morte celular (BENZIE, 1996).

A concentração de 30 µM de Trolox determinou maior retilinearidade nos gametas do que os observados no grupo Controle. Porém foi menos eficiente do que nas concentrações mais elevadas, podendo este fato ser explicado pela questão da dose-resposta (IRVINE, 1996), onde a quantidade deste antioxidante pode não ter sido suficiente para conferir proteção à célula espermática.

Segundo Aboagla e Terada (2004), diluidores contendo gema de ovo podem aumentar os efeitos do H₂O₂, devido à presença de ferro e outros metais de transição neste substrato. Assim, o grupo Controle pode ter sofrido maior ação das ROS, favorecendo a lipoperoxidação destes espermatozoides. Quanto maior a quantidade de células danificadas, maior liberação de ROS (ROVER Jr et al., 2001), o que justifica a interferência nos parâmetros da cinética espermática, apresentando os grupos Trolox

60 e 120 μM maiores valores para MP, LIN, STR, WOB, VSL e VAP, quando comparados aos grupos Controle, CAT 50 e 100 U/mL. Parâmetros de LIN e STR inferiores significam menor quantidade de células com movimento em linha reta, confirmado pela menor MP nos grupos controle, CAT 50 e 100 U/mL. Esta combinação de resultados pode interferir negativamente nos índices de fertilidade, uma vez que espermatozoides com tais características apresentam menor vida útil no sistema reprodutor da fêmea (GILLAN et al., 2008).

A análise ultraestrutural confirma os resultados obtidos na avaliação da cinética espermática para os grupos CAT 50 e 100 U/mL, indicando menor integridade celular. Pesquisas com sêmen ovino identificaram que ao início do processamento para criopreservação, há baixa atividade desta enzima (STEFANOV et al., 2004), por atividade biológica ainda desconhecida, o que pode estimular a formação de ROS, como o ânion superóxido, que, por sua vez, é responsável posteriormente pela inativação da própria CAT (FOLZ et al., 1999).

Na avaliação ultraestrutural e com uso da sonda fluorescente FITC-PNA, o CAT 100 U/mL apresentou resultados inferiores aos demais grupos. A CAT, neste caso, em maiores unidades, influenciou negativamente a criopreservação das células espermáticas, principalmente para a estrutura do acrossoma. Segundo Ladha (1998), espermatozoides ovinos possuem quantidade elevada de ácidos graxos insaturados, assim como maior concentração de esteróis na região acrossomal, o que pode facilitar tanto a ação das ROS na promoção da peroxidação lipídica quanto aumentar a fluidez da membrana, respectivamente, que pode induzir à reação acrossomal prematura, causando infertilidade (SILVA e GADELLA, 2006).

A teoria do não aproveitamento do antioxidante CAT neste experimento é fundamentada pelos resultados expressados no grupo CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL. Segundo Maxwell e Stojanov (1996), a necessidade da SOD nos sistemas biológicos poder ser quatro vezes maior do que a de CAT para atuar efetivamente contra as ROS. A SOD age removendo as ROS formadas durante os processos de análise, diluição e refrigeração das amostras de sêmen, e a CAT atua posteriormente na remoção dos H_2O_2 . Esta afirmativa foi ratificada nos resultados encontrados nas avaliações pós-descongelamento deste estudo, com achados satisfatórios em comparação aos grupos Controle, CAT 50 e 100 U/mL, nas avaliações da cinética e ultraestrutura.

Diante de tais constatações, é possível justificar os resultados encontrados neste experimento, pois a adição da CAT não melhorou os parâmetros espermáticos e

na maior concentração estudada (100 U/mL) foi deletéria à célula espermática para a integridade acrossomal e cinética. Provavelmente a CAT não foi devidamente aproveitada ou a dosagem pode ter sido superior às necessidades das células, uma vez que um antioxidante pode ser considerado pró-oxidante quando encontradas em quantidade excessiva (CAO e CUTLER, 1993).

Stefanov et al. (2004), analisando a adição da SOD em incubação de sêmen de reprodutores ovinos, constataram que este antioxidante enzimático é um efetivo removedor do ânion superóxido, e conseqüentemente, protege as funções espermáticas. Como há um sistema de proteção antioxidante, a SOD e a CAT atuam sinergicamente e a associação destes dois antioxidantes enzimáticos conferiu melhor preservação da cinética de espermatozoides congelados de carneiros, quando em comparação à utilização da CAT em doses mais elevadas.

A membrana plasmática que reveste a cabeça do espermatozoide foi mais sujeita a danos, em comparação à membrana da cauda espermática, nas condições deste experimento. Estas alterações podem ser explicadas pelas modificações ocorridas na fluidez da membrana plasmática de ovinos diante da redução de temperatura. Abaixo da temperatura de fase de transição, os lipídeos estão em fase gel, enquanto que acima desta temperatura tem início maior fluidez, correspondente à fase líquida cristalina (LADHA, 1998). Em carneiros, pesquisas revelam três fases de transições, a 37 °C, 26 °C e 17 °C (HOLT e NORTH, 1986), enquanto que espermatozoides humanos não apresentam estas modificações em decorrência da quantidade de colesterol presente na membrana desta espécie (PALLESCHI e SILVESTRONI, 1996). Esta constatação é interessante, uma vez que a membrana plasmática de ovinos, durante o processo de refrigeração, permanece fluida em algumas regiões e menos fluida em outras, podendo sofrer ação das ROS em maior intensidade principalmente na região acrossomal, que apresenta maior fluidez em decorrência de sua composição lipídica (TOSHIMORI e ITO, 2003).

Com base nos resultados de integridade de acrossoma, cinética e ultraestrutura espermática, é possível concluir que, a adição de CAT 50 e 100 U/mL ao diluente Tris-gema não preserva a viabilidade de espermatozoides ovinos congelados, enquanto que a adição de Trolox, nas concentrações de 60 e 120 µM e a associação de CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL proporcionam maior viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados.

5 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante a realização do Doutorado; à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro; e à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA/PB), pela autorização de uso dos reprodutores.

6 REFERÊNCIAS

- ABOAGLA, E.M.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1160-1172, 2004.
- AUDET, I.; LAFOREST, J.P.; MARTINEAU, G.P.; et al. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 626-633, 2004.
- 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.
- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, p. 233-261, 1996.
- BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRAD, M.A. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.
- BRASIL. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea do estado da Paraíba** – Diagnóstico do Município de Campo de Santana, 2005. 20 p.
- BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; O'FLAHERTY, C.M.; et al. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 2126-2135, 2005.
- CAO, G.; CUTLER, R.G. High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 17, n. 3, p. 189-201, 1993.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2ª Ed., Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; et al. Viability susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 99-111, 2000.

COLETO, Z.F.; GUERRA M.M.P.; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 101-104, 2002.

DANIKOWSKI, S.; SALLMANN, H.P.; HALLE, I.; et al. Influence of high levels of vitamin E on semen parameters of cocks. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 86, n. 11-12, p. 376-382, 2002.

De GRAAF, S.P.; EVANS, G.; GILLAN, L.; et al. The influence of antioxidants, cholesterol and seminal plasma on the *in vitro* quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, p. 217-227, 2007.

FOLZ, R.J.; ABUSHAMAA, A.M.; SULIMAN H.B. Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 7, p. 1055-1066, 1999.

GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M.C.; et al. Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 201-204, 2008.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.H.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p 187-195, 2004.

GUTHRIE, H.D.; WELCH G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2089-2100, 2006.

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

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 447-457, 1986.

IRVINE, D.S. Glutathione as a treatment for male infertility. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 6-12, 1996.

KESKES-AMMAR, L.; FEKI-CHAKROUN, N.; REBAI, T.; et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin e and selenium supplement on semen quality in infertile men. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 49, n. 2, p. 83-94, 2003.

- KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v. 46, p. 246-253, 2003.
- LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v. 165, p. 1-10, 1998.
- MAXWELL, W.M.C; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 1013-1020, 1996.
- MORTIMER, S.T. CASA – Practical Aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.
- MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p. 285-291, 2004.
- MOURA, A.; DESCHAMPS, J.C.; MORAES, J.C.F. Efeito da concentração e temperatura de adição de trealose em diluentes para a congelação de sêmen ovino em palhetas. **Ciência Rural**, v. 25, n. 1, p. 105-109, 1995.
- O'FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, n. 5, p. 269-275, 1997.
- PALLESCHI, S.; SILVESTRONI, L. Laurdan fluorescence spectroscopy reveals a single liquid-crystalline lipid phase and lack of thermotropic phase transitions in the plasma membrane of living human sperm. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1279, n. 2, p. 197-202, 1996.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; et al. Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85-98, 2003.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, J.L.; et al. Heterologous *in vitro* fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 475-482, 1998.
- ROVER Jr., L.; HÖER, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.
- SARAIVA, K.L.A.; SILVA, A.K.S.E.; WANDERLEY, M.I.; et al. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, p. 454-462, 2009.

- SARLÓS, P.; MOLNAR, A.; KOKAI, M.; et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 2, p. 235-245, 2002.
- SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.
- SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, p. 835-850, 1996.
- SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; et al. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 595-601, 2009a.
- SILVA, K.M.G.; MORAES, T.A.P.; SILVA, E.C.B.; et al. Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides equinos após descongelação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 42-49, 2009b.
- SILVA, P.N.F.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; et al. Criopreservação de sêmen ovino em diferentes estações climáticas: interferência da sazonalidade. In: SINCORTE - Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 4, 2009, João Pessoa-PB. **Anais...**, João Pessoa-PB, 2009c. (CD-ROM).
- SOARES, A.T.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 2, p. 53-63, 2009.
- STEFANOV, R.; ANGELOVA, M.; STEFANOVA, T.; et al. Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea 103* improves ram spermatozoa functions *in vitro*. **Andrologia**, v. 36, p. 51-56, 2004.
- TOSHIMORI, K.; ITO, C. Formation and organization of the mammalian sperm head. **Archives of Histology and Cytology**, v. 66, n. 5, p. 383-396, 2003.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E.; et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 269-278, 1997.
- YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, v. 76, p. 99-111, 2003.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 482-492, 2000.

Tabela 1. Porcentual (\pm erro padrão) de espermatozoides ovinos da raça Santa Inês criopreservados em Tris-gema suplementado com Trolox, CAT e associação de CAT e SOD com integridade da membrana plasmática, acrossoma e alto potencial da membrana mitocondrial

Grupos	iAc (%)	iMP (%)	aPMM (%)
Controle	59,83 \pm 7,75 ^a	32,92 \pm 2,59	69,92 \pm 6,60
Trolox 30 μ M	49,25 \pm 3,30 ^a	40,25 \pm 5,86	76,68 \pm 5,56
Trolox 60 μ M	47,00 \pm 5,99 ^a	45,16 \pm 3,78	84,00 \pm 6,71
Trolox 120 μ M	54,50 \pm 7,50 ^a	45,00 \pm 5,26	86,08 \pm 1,53
CAT 25 U/mL	52,42 \pm 5,34 ^a	36,17 \pm 5,59	81,75 \pm 1,99
CAT 50 U/mL	46,75 \pm 5,49 ^a	31,41 \pm 6,92	81,75 \pm 4,89
CAT 100 U/mL	41,67 \pm 7,86 ^b	32,75 \pm 3,83	89,08 \pm 1,34
CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL	55,00 \pm 8,66 ^a	34,75 \pm 4,78	81,75 \pm 2,98

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos. iAc= integridade de acrossoma; iMP= integridade de membrana plasmática; aPMM= alto potencial de membrana mitocondrial.

Tabela 2. Valores (média \pm erro padrão) dos parâmetros cinéticos de espermatozoides ovinos congelados em Tris-gema suplementado com os antioxidantes Trolox, CAT e associação de CAT e SOD

Grupos	MT (%)	MP (%)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Controle	81,28 \pm 1,64	6,50 \pm 1,64 ^b	36,63 \pm 0,79 ^b	59,68 \pm 0,77 ^c	61,27 \pm 0,60 ^b	59,97 \pm 4,61	21,93 \pm 1,72 ^b	36,72 \pm 2,77 ^b	3,67 \pm 0,10	6,47 \pm 0,22
Trolox 30 μM	80,43 \pm 2,90	9,92 \pm 1,31 ^{ab}	40,37 \pm 1,57 ^{ab}	62,53 \pm 2,13 ^b	64,20 \pm 1,27 ^{ab}	64,97 \pm 2,30	26,13 \pm 1,83 ^{ab}	41,62 \pm 1,71 ^{ab}	3,50 \pm 0,13	6,68 \pm 0,26
Trolox 60 μM	77,57 \pm 2,78	13,20 \pm 2,49 ^a	42,77 \pm 1,81 ^a	64,25 \pm 1,44 ^a	66,12 \pm 1,45 ^a	71,90 \pm 3,99	30,95 \pm 3,26 ^a	47,68 \pm 3,66 ^a	3,53 \pm 0,16	7,03 \pm 0,25
Trolox 120 μM	79,85 \pm 4,66	13,70 \pm 2,55 ^a	43,92 \pm 0,94 ^a	66,00 \pm 0,57 ^a	66,47 \pm 1,06 ^a	70,67 \pm 4,68	31,27 \pm 2,78 ^a	47,27 \pm 3,96 ^a	3,50 \pm 0,16	7,42 \pm 0,23
CAT 25 U/mL	81,58 \pm 3,29	9,97 \pm 2,63 ^{ab}	38,40 \pm 1,31 ^{ab}	60,27 \pm 1,11 ^c	63,47 \pm 1,03 ^{ab}	68,93 \pm 5,50	31,68 \pm 2,45 ^a	43,88 \pm 2,54 ^{ab}	3,50 \pm 0,12	6,73 \pm 0,26
CAT 50 U/mL	76,78 \pm 3,24	7,00 \pm 1,68 ^b	37,92 \pm 0,80 ^b	60,23 \pm 0,72 ^c	62,87 \pm 0,60 ^b	59,13 \pm 4,66	22,33 \pm 1,78 ^b	37,13 \pm 2,96 ^b	3,33 \pm 0,13	6,58 \pm 0,27
CAT 100 U/mL	79,40 \pm 2,02	6,70 \pm 1,94 ^b	37,47 \pm 0,94 ^b	59,95 \pm 0,92 ^c	62,40 \pm 0,62 ^b	58,03 \pm 3,29	21,88 \pm 2,00 ^b	36,27 \pm 2,46 ^b	3,40 \pm 0,05	6,40 \pm 0,34
CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL	78,53 \pm 2,53	12,23 \pm 2,33 ^a	40,37 \pm 1,61 ^{ab}	62,77 \pm 1,27 ^b	64,00 \pm 1,30 ^{ab}	69,88 \pm 2,92	28,42 \pm 2,82 ^a	44,87 \pm 3,02 ^{ab}	3,48 \pm 0,11	7,00 \pm 0,20

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos. MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; LIN= linearidade; STR= retilinearidade; WOB= oscilação; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade em linha reta; VAP= velocidade média do percurso; ALH= amplitude do deslocamento lateral da cabeça espermática; BCF= batimento flagelar cruzado.

Tabela 3. Porcentual (média \pm erro padrão) de estruturas preservadas na cabeça de espermatozoides ovinos *in natura* ou congelados em Tris-gema, suplementado com Trolox, CAT e associação de CAT e SOD, avaliado pela microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Grupos	Acrossoma (%)	Membrana plasmática (%)	Núcleo (%)
<i>In natura</i>	93,33 \pm 6,67 ^a	63,33 \pm 6,15 ^{ab}	100,00 \pm 0,00
Controle	56,67 \pm 6,15 ^b	63,33 \pm 3,33 ^{ab}	100,00 \pm 0,00
Trolox 30 μ M	56,67 \pm 6,15 ^b	73,33 \pm 6,67 ^{ab}	96,67 \pm 3,33
Trolox 60 μ M	63,33 \pm 6,15 ^a	83,33 \pm 6,15 ^{ab}	100,00 \pm 0,00
Trolox 120 μ M	60,00 \pm 5,16 ^{ab}	73,33 \pm 4,22 ^{ab}	100,00 \pm 0,00
CAT 25 U/mL	56,67 \pm 6,15 ^b	90,00 \pm 4,47 ^a	100,00 \pm 0,00
CAT 50 U/mL	43,33 \pm 6,14 ^c	70,00 \pm 4,47 ^{ab}	100,00 \pm 0,00
CAT 100 U/mL	33,33 \pm 4,22 ^c	40,00 \pm 7,30 ^b	100,00 \pm 0,00
CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL	60,00 \pm 5,16 ^{ab}	63,33 \pm 3,33 ^{ab}	100,00 \pm 0,00

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

Tabela 4. Porcentual (média \pm erro padrão) de estruturas preservadas na cauda de espermatozoides ovinos *in natura* ou congelados em Tris-gema, suplementado com Trolox, CAT e associação de CAT e SOD, avaliado pela microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Grupos	Mitocôndria (%)	Membrana Plasmática (%)	Axonema (%)
<i>In natura</i>	96,67 \pm 3,33 ^a	76,67 \pm 6,15	100,00 \pm 0,00
Controle	56,67 \pm 9,55 ^b	60,00 \pm 10,33	100,00 \pm 0,00
Trolox 30 μ M	50,00 \pm 6,83 ^c	73,33 \pm 6,67	96,67 \pm 3,33
Trolox 60 μ M	83,33 \pm 6,15 ^{ab}	86,67 \pm 4,22	100,00 \pm 0,00
Trolox 120 μ M	80,00 \pm 7,30 ^{ab}	73,33 \pm 8,43	100,00 \pm 0,00
CAT 25 U/mL	70,00 \pm 8,56 ^{ab}	70,00 \pm 4,47	100,00 \pm 0,00
CAT 50 U/mL	83,33 \pm 8,03 ^{ab}	53,33 \pm 13,33	93,33 \pm 6,67
CAT 100 U/mL	66,67 \pm 6,67 ^{ab}	66,67 \pm 4,22	100,00 \pm 0,00
CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL	76,67 \pm 6,15 ^{ab}	73,33 \pm 6,67	96,67 \pm 3,33

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos.

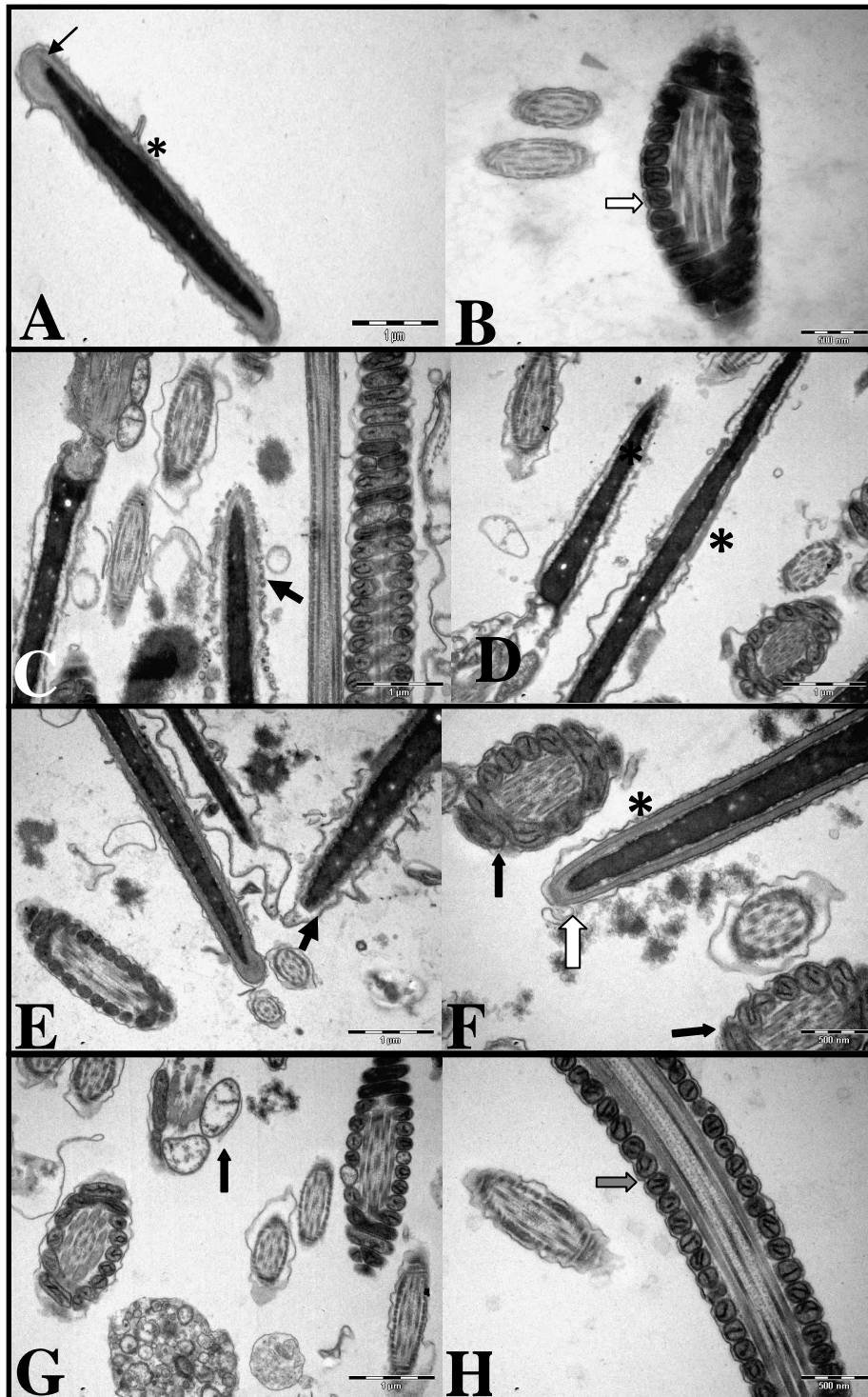


Figura 1. A – Espermatozoides *in natura*: corte transversal da cabeça espermática, região apical; membrana plasmática íntegra, com discreta ondulação (*); *perforatorium* (seta preta); B – Espermatozoides *in natura*: mitocôndrias íntegras (seta branca); C – Pós-descongelamento, Grupo controle: corte longitudinal da cabeça espermática, vesiculações na região apical (seta preta); D – Grupo controle: corte longitudinal da cabeça do espermatozoide, com perda de acrossoma e exposição da zona equatorial (*) E – Grupo CAT 100 U/mL: lesão de acrossoma (seta preta); F – Grupo CAT 25 U/mL: preservação das membranas plasmáticas (*), acrossoma (seta branca) e mitocôndrias (setas pretas). G – Grupo controle: vacuolização mitocondrial (seta preta); H – Grupo CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL: membrana plasmática preservada e mitocôndrias íntegras (seta cinza).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criopreservação de sêmen ovino é uma biotecnologia de fácil execução e de resultados satisfatórios, resultando em uma técnica viável para a preservação de material genético masculino. Embora os resultados do sêmen ovino pós-descongelção, neste estudo, sejam semelhantes aos obtidos na literatura, a adição de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos pode melhorar o rendimento desta biotécnica.

A vitamina E, nas concentrações de 60 e 120 μM pode ser adicionado ao crioprotetor rotineiramente utilizado para a congelação de espermatozoides ovinos, contribuindo para preservar a membrana plasmática da célula espermática, melhorar os índices de velocidade e, conseqüentemente, aumentar a vida útil deste gameta masculino. A SOD, na concentração de 100 U/mL pode também ser utilizada na congelação de espermatozoides ovinos, preservando as membranas biológicas e influenciando benéficamente a fertilização de oócitos. A CAT e a GSH podem preservar a membrana plasmática da célula espermática, desde que não utilizadas em concentração acima de 25 U/mL e 7 mM, respectivamente. Todavia, a associação de CAT e SOD confere resultados satisfatórios não apenas à estrutura da membrana plasmática, mas também a outras estruturas celulares.

No entanto, mais estudos com uso de diferentes concentrações de CAT e GSH, assim como de outros antioxidantes podem ser realizados para fundamentar a incorporação destes potentes removedores de ROS ao diluente de congelação espermática, assim como em diluentes de refrigeração e manutenção espermática na espécie ovina e em outras espécies de animais domésticos.