UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VIABILIDADE ESPERMÁTICA E GERAÇÃO DE METABÓLITOS REATIVOS DO OXIGÊNIO (ROS) NO SÊMEN OVINO CRIOPRESERVADO EM DILUIDOR ADITIVADO DE LAURIL SULFATO DE SÓDIO (OEP), TROLOX-C E CATALASE

MARCIANE DA SILVA MAIA

Botucatu - SP
Dezembro, 2006

MARCIANE DA SILVA MAIA

VIABILIDADE ESPERMÁTICA E GERAÇÃO DE METABÓLITOS REATIVOS DO OXIGÊNIO (ROS) NO SEMEN OVINO CRIOPRESERVADO EM DILUIDOR ADITIVADO DE LAURIL SULFATO DE SÓDIO (OEP), TROLOX-C E CATALASE

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Adj. Sony Dimas Bicudo

Botucatu - SP

Dezembro, 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Maia, Marciane da Silva.
Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio(ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OE)), trolox-C e catalase / Marciane da Silva Maia. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.
Orientador: Sony Dimas Bicudo
Assunto CAPES: 505040002

1. Ovino - Reprodução 2.Ovino - Inseminação artificial - Estudos experimentais 3. Sêmen - Criopreservação
CDD 636.308245

Palavras-chave: Antioxidantes; Catalase; Criopreservação; Lipoperoxidação; Radicais livres; Surfactante; Trolox

FOLHA DE AVALIAÇÃO

AUTOR: MAIA, Marciane da Silva

TÍTULO: Viabilidade Espermática e Geração de Metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no Semen Ovino Criopreservado em Diluidor Aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase.

Data: 18/12/2006

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Profa. Dra. Eunice Oba

Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini

Profa. Dra. Valquiria Hypólito Barnabé

Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra

Ao Homero, meu esposo, meu marido,
meu companheiro, meu amigo, meu tudo...
Fonte de estímulo intelectual constante.

Às minhas filhas Isabela e Iana.
Meu coração está preso a vocês
por uma corrente com elos tão fortes
que jamais serão rompidos.

À minha mãe Flora.
Seu exemplo de vida me estimulou
a buscar os meus objetivos
e nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha família: ao Homero por abdicar da vida intelectual e cultural que uma cidade maior pode oferecer para ficar ao meu lado e de nossas filhas aqui em Botucatu. Ás minhas filhas por terem superado os traumas da mudança e se adaptado tão bem à nova vida e por suportarem a minha “presença – ausência” nos últimos meses da finalização da Tese;

Ao Eng°. Agrônomo Fernando Antônio Marinho Pereira, ex-diretor presidente da EMPARN, sem sua ajuda, não teria conseguido a liberação para a realização deste curso;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo, antes de tudo, por ter me aceitado como orientanda sem nenhum conhecimento prévio e me acolhido tão bem; em seguida, por ter confiado e acreditado na minha capacidade para desenvolver a ousada meta a que nos propomos e finalmente, por fornecer os subsídios necessários para a realização do projeto, ajudar a dirimir as dúvidas e quebrar as pedras que apareceram no caminho, pelo interesse constante com o meu bem-estar e por estar sempre disponível quando precisei dele;

À amiga Tânia Vasconcelos Cavalcante, por ter me enviado material bibliográfico para a elaboração do projeto inicial e por ter me ajudado na busca de um orientador;

Aos meus colegas do laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Ovinos e Caprinos: Hymerson, Leandro, Daniel, Carmem e Renata, pelo grande auxílio durante o desenvolvimento do experimento e pelo convívio amistoso nos momentos bons e nos momentos maus;

À estagiária Isabel Cristina Saltaren, pela colaboração dada na fase final do experimento, quando eu já estava correndo contra o relógio;

À Érika Morani por, gentilmente, ter me passado a metodologia para a realização da dosagem dos radicais livres;

À Juliana Borges, pela troca de experiências durante a realização dos ensaios, o que me ajudou a esclarecer dúvidas e corrigir os rumos, quando necessário;

Aos criadores de ovinos Santa Inês: Carmem Sicherle, Carlos Roberto Teixeira, José de Oliveira Prado, André Camargo Assumpção e Hélio Duarte, por fornecerem os carneiros para a realização dos experimentos;

Ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, por disponibilizar as suas instalações, laboratórios e equipamentos para o desenvolvimento do projeto;

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, em particular à Cristina, ao Edílson, ao Valter e ao Márcio, por terem me ajudado sempre que recorri a eles;

À FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo), pelo suporte financeiro por meio da concessão do auxílio pesquisa, processo: 03/07734-8;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que me falha a lembrança, no momento.

"Na ciência o conhecimento é particularizado,
construído peça a peça".

Robert Foley

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Estrutura molecular da Vitamina E (α - tocoferol) e do Trolox C (6-hidroxi-2,5,7,8-tetra-metil-chroman-2-acido carboxílico) 17

FIGURA 2- Sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen - (a) partes integrantes do sistema, (b) acondicionamento das palhetas no cilindro, (c) refrigeração, (d) congelação. 47

FIGURA 3 - Motilidade Total (média ± ep) estimada pelo método CASA e taxa de degradação da motilidade (TDM) para o sêmen ovino fresco (SF) e criopreservado com os diluidores GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1. 52

FIGURA 4 - Integridade de membrana (média ± ep) estimada pelo método de fluorescência (IP + DIC), para o sêmen ovino fresco (SF) e criopreservado com os diluidores GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1. 55

FIGURA 5 - Integridade de membrana plasmática e acrossomal pela associação das sondas fluorescentes IP + DIC: (a) espermatozóide com membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial intactas, (b) espermatozóide com membrana plasmática e acrossomal lesadas e mitocondrial intacta, (c) espermatozóide com membrana plasmática lesada e membrana acrossomal e mitocondrial intacta. 55

FIGURA 6- Percentual de espermatozóides com membrana plasmática e acrossomal intactas (média ± ep) estimada pelo método de fluorescência (IP, FITC-PSA) para o sêmen ovino criopreservado com os diluidores: TRIS, TRIS + Trolox (TRO+), TRIS + Catalase (CAT+) e TRIS + Trolox e Catalase (TRO/CAT+). 82

FIGURA 7- Espermatozóides com membrana acrossomal lesada (média ± ep) estimada pelo método de fluorescência (FITC-PSA), para o sêmen ovino criopreservado com os diluidores: TRIS, TRIS + Trolox (TRO+), TRIS + Catalase (CAT+) e TRIS + Trolox e Catalase (TRO/CAT+). 83

FIGURA 8- Avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial do espermatozóide, pela combinação das sondas IP, FITC-PSA e JC-1. 84

FIGURA 9- Curva de calibração do ensaio das TBARS usando o malonaldeído bis (dimetil acetal) – MDA nas concentrações de 1 a 20μMol. 85

FIGURA 10- Lipoperoxidação no sêmen ovino criopreservado nos diluidores TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT+, na presença ou não do catalisador ($FeSO_4$). P<0,05 86

FIGURA 11- Reação cinética, da redução do NBT a formazan pelo ânion superóxido gerado pelo sistema hipoxantina-xantina oxidase, durante 180 segundos. 87

FIGURA 12- Geração de ânion superóxido no sêmen ovino criopreservado nos diluidores TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT+, na presença ou não do sistema gerador de O_2^- hipoxantina – xantina oxidase (HXO). P<0,05 para letras diferentes sobre as colunas nas amostras incubadas com H-XO ou * no TRIS e CAT+ comparado ao TRO+ e TRO/CAT+, nas amostras incubadas sem H-XO. 89

FIGURA 13- Curva de calibração do ensaio de oxidação do phenol red usando H_2O_2 nas concentrações de 1 a 60µMol. 90

FIGURA 14- Geração de peróxido de Hidrogênio no sêmen ovino criopreservado nos diluidores TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT+, na presença ou não de H_2O_2. Diferenças indicadas por letras sobre as colunas para amostra incubada com H_2O_2 ou * para amostra sem H_2O_2 no TRIS comparado ao TRO+ e TRO/CAT+. (P < 0,05). 91

FIGURA 15- Capacidade antioxidante (CAOX) do diluidor TRIS na remoção de TBARS, H_2O_2 e O_2^-. CAOX é a diferença entre a concentração gerada na reação catalisada (máximo) e na espontânea. 95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Classificação dos espermatozóides de acordo com a coloração fluorescente emitida na combinação das sondas: iodeto de propidium (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC) 45

TABELA 2- Esquema da Análise de Variância – Experimento 1 50

TABELA 3- Médias ± erro padrão dos parâmetros da cinética espermática: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e linearidade (LIN) obtidos pelo sistema de análises computadorizada da motilidade espermática (CASA) no sêmen ovino fresco e congelado nos diluidores GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1. 52

TABELA 4– Média ± erro padrão da porcentagem de espermatozóides ovino com acrossomo íntegro (ACROS) em microscopia de contraste de fase e Integridade de membrana plasmática e acrossomal em microscopia de fluorescência usando a combinação das sondas iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC) - IM1: membrana plasmática e acrossomal íntegras; IM2: membrana plasmática danificada e membrana acrossomal intacta; IM3: membrana plasmática e acrossomal danificada, no sêmen fresco e congelado nos diluidores GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1. 54

TABELA 5- Percentual de espermatozóides (x±ep) ovinos não capacitados (F), capacitados com acrossomo intacto (B) e acrossomo reagidos (AR) após criopreservação nos diluidores GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1. 56

TABELA 6- coeficiente de correlação linear (r) entre as variáveis: capacitação espermática, motilidade (CASA) e integridade de membrana do sêmen ovino criopreservado, Botucatu – 2006. 57

TABELA 7- Classificação das células em categorias de acordo com a integridade de membrana plasmática e acrossomal e a função mitocondrial detectada pelas sondas IP, FITC-PSA e JC-1. 71

TABELA 8- Esquema da Análise de Variância – Experimento 2 77

TABELA 9- Médias ± erro padrão dos parâmetros da cinética espermática: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), freqüência de batimentos do flagelo (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), espermatozóides rápidos (RAP) e estáticos (STATIC) obtidos pelo sistema de análises computadorizada da motilidade espermática (CASA) no sêmen ovino congelado nos diluidores TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT+ 79

TABELA 10- Médias ± erro padrão dos parâmetros espermáticos relativos à integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial avaliados pela combinação das sondas fluorescentes: iodeto de propídio (IP), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC/PSA) e iodeto de 5,5',6,6' tetracloro- 1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) do sêmen ovino congelado nos diluidores TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT+. 81

TABELA 11- Médias ± erro padrão das concentrações de substancias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) geradas no sêmen ovino criopreservado durante a lipoperoxidação espontânea (LE) ou catalisada por 0,24mmol de $FeSO_4$-$7H_2O$ (LC) de acordo com o tratamento. Resultados expressos em nmol de TBARS/10^8 espermatozóides. 86

TABELA 12- Médias ± erro padrão das concentrações de ânion superóxido (O_2^-) gerado no sêmen ovino descongelado e no sêmen na presença de O_2^- exógeno gerado pelo sistema hipoxantina-xantina oxidase (HXO), de acordo com o tratamento. Resultados expressos em nmol de O_2^- /50 x10^6 espermatozóides. 88

TABELA 13- Médias ± erro padrão das concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado no sêmen ovino descongelado e no sêmen na presença de H_2O_2 exógeno (100nmol/ml) adicionado ao meio reacional, de acordo com o tratamento. Resultados expressos em nmol de H_2O_2/50 x10^6 espermatozóides/30min. 91

TABELA 14- Médias ± erro padrão das concentrações de substancias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) geradas nos diluidores descongelados na lipoperoxidação espontânea (LE) e na lipoperoxidação catalisada por 0,24mmol de $FeSO_4$-$7H_2O$ (LC), de acordo com o tratamento. Resultados expressos em nmol de TBARS/mL diluidor. 92

TABELA 15- Médias ± erro padrão das concentrações de ânion superóxido (O_2^-) gerado nos diluidores e nos diluidores na presença de O_2^- exógeno gerado pelo sistema hipoxantina-xantina oxidase (HXO), de acordo com o tratamento. Resultados expressos em nmol de O_2^- /mL diluidor. 93

TABELA 16- Médias e erro padrão das concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pelos diluidores, e nos diluidores na presença de H_2O_2 exógeno (100nmol/ml) adicionado ao meio reacional, de acordo com o tratamento. Resultados expressos em nmol de H_2O_2/mL/30min. 94

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1- COMPOSIÇÃO DOS DILUENTES UTILIZADOS 131

ANEXO 2- RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIANCIA – EXPERIMENTO 1 133

Anexo 2.1- Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação computadorizada da motilidade espermática do sêmen ovino congelado, tendo como fontes de variação os tratamentos (SF, GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1) e os carneiros. Experimento 1. 133

Anexo 2.2 – Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal do sêmen ovino congelado, tendo como fontes de variação os tratamentos (SF, GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1) e os blocos (carneiros). Experimento 1. 134

Anexo 2.3- Resumo da análise de variância dos parâmetros da capacitação espermática do sêmen ovino congelado, tendo como fontes de variação os meios diluidores (GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1) e os carneiros. Experimento 1. 135

ANEXO 3- ENSAIO DA LIPOPEROXIDAÇÃO PELO MÉTODO TBA 136

ANEXO 4- ENSAIO DO ÂNION SUPERÓXIDO 138

ANEXO 5- ENSAIO DO PEROXIDO DE HIDROGÊNIO 140

ANEXO 6- RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIANCIA – EXPERIMENTO 2 142

Anexo 6.1: Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA) do sêmen ovino congelado, tendo como causas de variação os tratamentos (diluidores: TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT +) e os blocos (carneiros). Experimento 2. 142

Anexo 6.2- Resumo da análise de variância dos parâmetros da analise de integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal e potencial de membrana mitocondrial pelo método de fluorescência (FITC/PSA, IP, JC-1) e microscopia de contraste de fase, do sêmen ovino congelado, tendo como causas de variação os tratamentos (diluidores TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT +) e os blocos (carneiros), Experimento 2. 144

Anexo 6.3- Resumo da análise de variância da geração de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e lipoperoxidação (TBARS) no sêmen ovino congelado, na presença ou não de um catalisador químico da geração de cada ROS ($FeSO_4$, HXO e H_2O_2-E) tendo como causas de variação os tratamentos (diluidores: TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT +) e os blocos (carneiros), Experimento 2. 146

Anexo 6.4- Resumo da análise de variância da geração de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e lipoperoxidação (TBARS) no diluidor, na presença ou não de um catalisador químico da geração de cada ROS ($FeSO_4$, HXO e H_2O_2-E), tendo como causas de variação os tratamentos (TRIS; TRO+, CAT+ e TRO/CAT +), Experimento 2. 147

LISTA DE ABREVIATURAS

ACROS	Acrossomo íntegro, pelo contaste de fase
ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
APM	Alto potencial de membrana mitocondrial
AR	Espermatozóides capacitados com acrossomo reagido
B	Espermatozóides capacitados com acrossomo intacto
BCF	Frequencia de batimentos do flagelo
BHT	Hidroxitolueno butilatado
BPM	Baixo potencial de membrana mitocondrial
CAOX	Capacidade antioxidante
CASA	Sistema computadorizado de avaliação da motilidade espermática
CAT	Catalase
CAT+	Diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP + Catalase
CTC	Clortetraciclina
DIC	Diacetato de carboxifluoresceína
F	Espermatozóides não capacitados
F1	membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial
F2	membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial
F3	membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial
F4	membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial
F5	membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial
F6	membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial
F7	membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial
F8	membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial;
FITC/PSA	Aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína
GGL	Diluidor Glicina-gema-leite
GPx	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa Dissulfito ou glutationa oxidada
HXO	Sistema hipoxantina-xantina oxidase
IM1	Membrana plasmática e acrossomal íntactas
IM2	Membrana plasmática danificada e membrana acrossomal íntacta
IM3	Membrana plasmática e acrossomal danificadas
IP	Iodeto de Propídio
JC-1	iodeto de 5,5’,6,6’ tetracloro-1,1,3,3’- tetraetilbenzimidazolil

	carbocianina
LIN	Linearidade
MDA	Malonaldeído
MF	Motilidade Final
MI	Motilidade inicial
MP	Motilidade Progressiva
MPAI	Membrana plasmática e acrossomal intactas
MT	Motilidade Total
NBT	Nitro Blue tetrazolium
OEP	*Orvus es Paste*
Prx	Peroxiredoxinas
PSA+	Acrossomos corados pelo FITC/PSA
RAP	Rápidos
ROS	Metabólitos Reativas do Oxigênio
SF	Sêmen Fresco
SOD	Superóxido dismutase
STATIC	Espermatozóides imóveis
STR	Retilinearidade
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido tiobarbitúrico
TDM	Taxa de degradação da Motilidade
TPx	Tioredoxinas peroxidases
TRIS	Diluidor Tris-glicose-gema (Exp1) ou Diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP (Exp 2)
TRIS 0,5	Diluidor Tris-glicose-gema com 0,5% de OEP
TRIS 1	Diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP
TRO/CAT+	Diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP + Trolox -C e Catalase
TRO+	Diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP + Trolox -C
VAP	Velocidade de trajeto
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade progressiva

SUMÁRIO

Página

RESUMO 1
ABSTRACT 3
1. INTRODUÇÃO 5
2. REVISÃO DE LITERATURA 7
2.1 Criopreservação do sêmen..... 7
2.2 Composição do Diluidor 9
2.3 Metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) 12
a) Radical superóxido (O_2^-) 12
b) Radical hidroxila (OH°)..... 13
c) Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) 13
2.4 Antioxidantes 13
a) Catalase..... 14
b) α -Tocoferol (Vitamina E)..... 15
c) Trolox-C (6- hidroxi -2,5,7,8- tetrametilcroman – 2 – acido carboxílico) 16
2.5 ROS, Antioxidantes e Função Espermática..... 18
2.5.1 Produção e degradação de ROS no sêmen..... 18
2.5.2 ROS e capacitação espermática..... 23
2.5.3 Danos causados ao espermatozóide pelos ROS..... 24
a) Lipoperoxidação..... 26
2.5.4 Uso de antioxidantes no diluidor e seu efeito na viabilidade espermática..... 30
2.6 Avaliação da Fertilidade do Sêmen..... 33
3. HIPÓTESE 41
4. OBJETIVOS 42
5. EXPERIMENTO 1..... 43
5.1 Materiais e Métodos..... 43
5.2 Resultados..... 51
5.3 Discussão..... 58
5.4 Conclusões..... 66
6. EXPERIMENTO 2..... 67

6.1 Materiais e Métodos..... 67
6.2 Resultados..... 78
6.3 Discussão..... 96
6.4 Conclusões..... 109
7. CONCLUSÃO GERAL..... 110
8. REFERÊNCIAS..... 111
9. ANEXOS..... 131

RESUMO

MAIA, M.S. Viabilidade Espermática e Geração de Metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no Semen Ovino Criopreservado em Diluidor Aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase. 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, Botucatu, 2006.

O Objetivo deste estudo foi determinar o efeito da adição do surfactante lauril sulfato de sódio (Orvus es Paste – OEP) e dos antioxidantes Trolox-C (6-hidroxi-2, 5,7,8-tetrametilcroman-2-acido carboxílico) e catalase ao meio diluidor, na motilidade espermática, integridade de membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial, estádio de capacitação e geração de radicais livres no espermatozóide ovino pós-descongelação. Para isso, foram realizados dois experimentos. No Experimento 1, avaliou-se o efeito da adição do surfactante ao diluidor. O sêmen de 10 carneiros foi coletado por meio de vagina artificial e diluído para uma concentração final de $400x10^6$ espermatozóides/mL no meio Tris-gema contendo OEP (0; 0,5 e 1%) ou no diluidor glicina-gema-leite (controle). A motilidade foi determinada pelo sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA), a integridade de membrana pela combinação dos corantes fluorescente iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína (IP+DIC) e o estádio de capacitação pela técnica da CTC. Houve efeito significativo do tratamento em todos os parâmetros da motilidade, na integridade de membranas e na capacitação espermática. A adição de 0,5% ou 1% de OEP ao diluidor TRIS-gema aumentou significativamente ($P<0,05$) a motilidade, a integridade de membranas e o percentual de espermatozóides não capacitados, comparado ao controle. O diluidor TRIS 1 foi selecionado para utilização como meio base para o experimento 2. No Experimento 2, foi determinado o efeito da adição dos antioxidantes ao diluidor. O sêmen foi coletado e os seguintes tratamentos foram aplicados: T1- TRIS (controle), T2-TRO+ (diluidor T1 + Trolox, $50\mu M/10^8$ espermatozóides), T3-CAT+ (diluidor T1 + catalase, $50\mu g/mL$), T4- TRO/CAT+ (diluidor T1 + Trolox e Catalase, nas mesmas concentrações utilizadas no T2 e T3). A motilidade espermática foi

determinada pelo sistema CASA, a integridade de membrana plasmática e acrossomal e a função mitocondrial foram avaliadas pela combinação das sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e JC-1. A lipoperoxidação foi medida pela técnica dos TBARS, a geração de superóxido pela técnica de redução do nitro blue tetrazolium (NBT) e a geração de peróxido de hidrogênio pelo método do Phenol Red. A adição dos antioxidantes sozinhos ou em combinação não aumentou significativamente (P<0,05) a motilidade total ou as velocidades espermáticas, nem o potencial de membrana mitocondrial em relação ao controle. No entanto, a motilidade progressiva e o percentual de espermatozóides viáveis com membrana plasmática e acrossomal intacta foram significativamente (P<0,05) maior no CAT+ do que no controle. Não houve diferença significativa (P>0,05) nos níveis de lipoperoxidação espontânea no sêmen entre os tratamentos. A geração de superóxido foi menor (P<0,05) no sêmen congelado nos diluidores TRIS e CAT+ que no TRO+ e TRO/CAT+, enquanto que a geração de peróxido de hidrogênio foi maior no sêmen congelado no TRIS e CAT+ e menor no TRO+ e TRO/CAT+. Os resultados sugerem que o processo de congelação e descongelação do espermatozóide ovino provoca alterações na motilidade, na integridade de membrana plasmática e acrossomal e induz mudanças semelhantes à capacitação nas membranas espermáticas. Evidenciou-se a geração de metabólitos reativos do oxigênio durante a criopreservação do sêmen. A adição de catalase ao diluidor Tris-gema melhorou a viabilidade do espermatozóide ovino após a congelação, em relação aos outros diluidores avaliados, podendo ser indicado como aditivo para os meios de congelação do sêmen ovino.

Palavras-chave: antioxidantes, surfactante, lipoperoxidação, radicais livres, catalase, trolox, criopreservação, sêmen ovino.

ABSTRACT

MAIA, M.S. Sperm viability and reactive oxygen species (ROS) generation in ram semen cryopreserved in extenders supplemented with sodium lauryl sulfate (OEP), Trolox-C and catalase. 2006. Tesis (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, Botucatu, 2006.

The aim of this study was to determine the effect of addition of surfactant sodium lauryl sulfate (Orvus es Paste – OEP), and antioxidants, Trolox-C (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxilic acid) and catalase to an extender on the motility, plasmatic and acrosomal and mitochondrial membrane integrity, capacitation status and free radicals generation of post thaw ram spermatozoa. Two experiments were performed. In Experiment 1, the effect of addition of surfactant was evaluated. The semen was collected from ten rams by artificial vagina and it was diluted to a final concentration of 400x 10^6 sperm/mL in egg yolk-Tris extender containing OEP (0, 0.5 and 1%) or glycin-egg yolk-milk extender (control). The sperm motility was evaluated using a computer-assisted sperm analysis (CASA); the membrane integrity was verified using the fluorescent stains (propidium iodide and carboxyfluorescein diacetate) and the capacitation status determined by CTC technique. There was a significant treatment effect in all parameters involving sperm motility, membrane integrity and spermatic capacitation. The addition of OEP 0.5% or 1% to the egg yolk-Tris extender improved ($P<0.05$) the motility and membrane integrity and the percentage of uncapacited spermatozoa compared to the control. Then, the TRIS 1 extender was selected to be used at experiment 2. Experiment 2: the Exp 2 aimmed to determine the effect of antioxidants addition to the extender. Semen was collected and these treatments were applied: T1 - egg yolk-Tris extender (control), T2- TRO+ (T1 extender +Trolox, 50μM/10^8 spermatozoa), T3- CAT+ (T1 extender + catalase, 50μg/mL) and T4 – TRO/CAT+ (T1 extender + trolox and catalase on the concentrations used in T2 and T3). Motility was determined by CASA system, plasmatic and acrosomal

membrane integrity and mitochondrial function were evaluated with PI, FITC-PSA and JC-1 association. The lipid peroxidation was measured by TBARS technique, and superoxide content was measured by a nitro blue tetrazolium (NBT) reduction assay and hydrogen peroxide was measured by Phenol Red assay. The addition of antioxidants either alone or in combination did not significantly increased (P<0,05) the following parameters: total motility, spermatic speeds, and potential of mitochondrial membrane when compared to the control. However, the progressive motility and the percentage of viable spermatozoa with intact plasmatic and acrosomal membrane were, significantly (P<0,05) greater in the CAT+ than the control. The spontaneous lipid peroxidation in the semen was not significant difference (P>0,05) among treatments. The superoxide content was lower (P<0,05) in the cryopreserved semen while using TRIS and CAT+ extenders that in TRO+ and TRO/CAT+ while the hydrogen peroxide content was higher in the semen frozen with the TRIS and CAT+ and lower when TRO+ and TRO/CAT+ were used. These results suggest that freezing and thawing of ram spermatozoa leads to alterations on motility, plasmatic and acrosomal membrane integrity and induces capacitation-like membrane changes in spermatozoa. The data provide evidence that reactive oxygen species are produced during the cryopreservation of ram semen. The addition of catalase to the egg yolk-Tris extender improved the viability of the frozen-thawed ovine spermatozoa when compared to the other extenders, which supports the beneficial effect of this additive on ovine semen freezing extenders.

Key words: antioxidants, surfactant, lipid peroxidation, free radicals, catalase, Trolox, cryopreservation, ram semen.

1. INTRODUÇÃO

Desde que Lazzaro Spallanzani em 1780 provou que era possível ocorrer fecundação depois da deposição do sêmen, de forma artificial, no genital feminino, as biotécnicas relacionadas à reprodução têm evoluído. No início, o sêmen era utilizado na sua forma “in natura” e apenas fracionado e depositado no fundo da vagina da fêmea, obtendo-se taxas de fertilidade razoável. Esse método ainda continua sendo adotado em larga escala, mas requer manipulação rápida e uso imediato do sêmen. Porém, com o passar dos anos os estudos foram evoluindo e surgiu a necessidade de se aumentar a capacidade fecundante dos reprodutores e de conservar o material seminal por um maior período de tempo. Uma forma de alcançar o primeiro objetivo é aumentando o volume do ejaculado por meio da utilização de diluidores e para atingir o segundo objetivo é necessário a criopreservação.

O grande avanço na criopreservação do espermatozóide de mamíferos só foi dado com a descoberta do efeito crioprotetor do glicerol por Polge et al., (1949). A partir daí, o espermatozóide de várias espécies tem sido criopreservado com sucesso. Entretanto, o sucesso da criopreservação de sêmen é apenas parcial, uma vez que cerca da metade dos espermatozóides são destruídos ou danificados pela congelação e descongelação (baseado no sêmen bovino, que é a espécie onde se obtém os melhores resutados). Isso ocorre porque durante o processo de criopreservação a célula passa por uma série de alterações estruturais causadas pelo gradiente osmótico gerado entre o meio intra e extracelular, que podem resultar em danos a membrana plasmática e acrossomal, bem como a outras estruturas espermáticas.

Assim, para o sucesso da criopreservação, a composição do meio de congelação ou diluidor é muito importante para que se obtenha uma taxa de sobrevivência adequada. Com esse objetivo, dezenas de diluidores já foram desenvolvidos e vários tipos de substâncias crioprotetoras adicionadas a eles e testadas. Entre essas substâncias, as mais utilizadas atualmente são a gema de ovo e o glicerol.

Diante disso, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da adição de compostos que ajudem a manter a integridade de membrana e prevenir o estresse oxidativo ao diluente Tris-gema, que é o mais utilizado para a

congelação de sêmen ovino e com isso, aumentar a proteção ao espermatozóide durante a congelação e descongelação.

Para atingir nosso objetivo, foram realizados dois experimentos. O primeiro para avaliar o efeito da adição de um surfactante ao meio diluidor e o segundo avaliando o efeito da adição de antioxidantes sobre a geração de radicais livres e a congelabilidade do sêmen.

Os surfactantes, também chamados de detergentes, são substancias que atuam sobre os glóbulos de gordura presentes no diluidor, dissolvendo-os de forma a se tornarem mais disponíveis para incorporação na membrana espermática.

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de desvendar o mecanismo de ação e a função dos oxidantes e antioxidantes na atividade reprodutiva. Em humanos já está comprovado o efeito negativo do estresse oxidativo na fertilidade masculina, bem como a participação dos metabólitos reativos do oxigênio (ROS) nos eventos fisiológicos da capacitação espermática. Nas diferentes espécies de animais domésticos os estudos têm avançado, mas ainda existem dúvidas e contradições a serem esclarecidas.

A adição de antioxidantes aos diluidores para congelação do sêmen tem sido utilizada em várias espécies com o objetivo de minimizar ou reverter os efeitos danosos causados pelos metabólitos reativos do oxigênio (O_2^-, OH, H_2O_2) ao espermatozóide.

No presente estudo, foram avaliados os efeitos da adição de dois antioxidantes e um detergente ao diluidor. Os antioxidante utilizados foram a catalase (enzimático), que decompõe H_2O_2 a água e oxigênio molecular e o Trolox C (não enzimático), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E, que atua quebrando a reação em cadeia da lipoperoxidação. E o detergente OEP (Orvus es Paste).

Espera-se que os resultados aqui obtidos possam contribuir para compor o imenso quebra-cabeça que tem sido à busca da solução do problema de fertilidade do sêmen ovino criopreservado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Criopreservação do sêmen

A sobrevivência do espermatozóide de carneiro criopreservado é afetada por vários fatores, incluindo a composição do diluidor, a concentração de glicerol ou outro crioprotetor, a embalagem (palheta, minitubo, pelets), a velocidade de congelação e descongelação, bem como, a qualidade do sêmen usado para congelação e a temperatura inicial de congelação (SALAMON & MAXWELL, 1995; SALAMON & MAXWELL, 2000; BAG et al., 2002).

O espermatozóide do carneiro é sensível a mudanças extremas de temperatura durante o processo de congelação-descongelação, o que é prejudicial a motilidade do espermatozóide e a integridade de membrana (SALAMON & MAXWELL, 1995). Os danos causados à membrana espermática ocorrem numa faixa de temperatura entre -15°C e -60°C e não durante a estocagem em nitrogênio líquido (MAZUR, 1984) citado por Salamon & Maxwell (2000). No caso do espermatozóide do carneiro, a maioria dos danos ocorre entre -10^{0}C e -25^{0}C; região de cristalização do gelo (SALAMON & MAXWELL, 1995). Segundo Watson (1995), o processo de desidratação celular que acompanha a congelação lenta é potencialmente, benéfico para a sobrevivência da célula, enquanto taxas de congelação rápidas são consideradas como a causa da morte celular. Byrne et al., (2000) avaliaram a influência de duas curvas de congelação (rápido: 5^{0}C / min de +5 a –25°C; e *lento*: 0,5°C/min de +5 a –25°C), através dessa zona crítica (-10 a –25°C), sobre a fertilidade do espermatozóide *in vivo* e *in vitro*. Na curva de congelação rápida houve diferença significativa na porcentagem de prenhez (IA uterina 60% x 40%; IA cervical 13% x 0%).

Colas (1975) e Watson & Martin (1974) observaram que a sobrevivência do espermatozóide de carneiro congelado em palhetas depende da temperatura inicial de congelação. Bag et al., (2002) obtiveram a melhor taxa de sobrevivência (motilidade 71%) de espermatozóides quando as palhetas foram congeladas sob condições controladas a –125°C. Salamon (1970) observou que a congelação a -79 ou -140^{0}C produziu uma maior proporção de espermatozóides móveis, que abaixo destas temperaturas. Já Colas (1975)

relatou que a sobrevivência de espermatozóides após a descongelação era pequena, quando a temperatura inicial de congelação era maior que -75^{0}C.

Maxweel et al., (1995) obtiveram uma maior porcentagem de espermatozóides móveis (45,7%) em palhetas de 0,5ml, quando a congelação foi realizada a 6cm acima do nível do Nitrogênio líquido, o que dá uma temperatura em torno de -60 a -80ºC.

A viabilidade dos espermatozóides tem sido avaliada pela integridade de sua membrana externa, uma vez que esta, serve como proteção ao gameta masculino.

O processo de criopreservação causa danos às membranas espermáticas. Geralmente, as membranas afetadas são a plasmática, a acrossomal externa e a mitocondrial. A desestabilização da membrana plasmática após a congelação assemelha-se a uma capacitação fisiológica do espermatozóide. O espermatozóide capacitado e/ou com acrossomo reagido tem uma vida limitada, reduzindo assim a fertilidade (WATSON, 1995; JANUSKAUSKAS et al., 1999).

As mudanças bruscas de temperatura durante os processos de congelação e descongelação alteram a organização dos componentes estruturais da membrana plasmática, afetando as suas propriedades. Essas alterações estão associadas a mudanças na permeabilidade e na habilidade de sofrer fusão. Além disso, os espermatozóides podem apresentar inchaços e rupturas na membrana plasmática e acrossomal externas, alterações na fluidez da membrana, desregularização no influxo de cálcio intracelular e alterações na atividade enzimática (JANUSKAUSKAS et al., 1999).

A criopreservação pode produzir uma sub-população com menor tempo de vida *in vivo*, reduzindo efetivamente a eficiência da população como um todo. Após a criopreservação, os espermatozóides sobreviventes contêm mais cálcio intracelular que antes, refletindo em dano à membrana no mecanismo de permeabilidade seletiva (BAILEY et al., 2000). Em espermatozóides humanos, a criopreservação causa aumento na concentração de cálcio intracelular e perda de receptores de progesterona com lesão á membrana plasmática, ambos contribuindo para a redução da fertilidade do sêmen congelado (McLAUGHLIN & FORD, 1994).

A cromatina espermática é um material dinâmico e potencialmente capaz de ser influenciado pela criopreservação (WATSON, 1995). A resistência do espermatozóide à desintegração do DNA é um parâmetro importante na fertilidade (TEJEDA et al., 1984).

O dano ao DNA pode ser investigado pelo teste de COMET ou pela coloração do núcleo avaliado por microscopia epifluorescente ou citometria de fluxo (WATSON, 2000). Resultados da fluorescência com Acridine Orange na coloração de sêmen têm sido reportados como indicadores importantes do potencial de fertilização de espermatozóides humanos. Por essa razão, esse teste tem sido sugerido como procedimento prático e clinicamente significativo para determinar a qualidade do sêmen durante investigações de infertilidade em homens (TEJEDA et al., 1984).

2.2 Composição do Diluidor

O diluidor mais comumente usado para sêmen ovino é o a base de TRIS (tris -hidroximetil aminometano). Outros diluidores incluem lactose, glicose ou rafinose, com gema de ovo ou leite de vaca desnatado. O glicerol é acrescentado em várias concentrações como crioprotetor (SALAMON & MAXWELL, 2000).

A gema de ovo é considerada um crioprotetor, e por isso, é um componente comum na composição de vários diluidores de sêmen. Segundo Salamon & Maxwell (2000), ela é um componente importante dos diluidores para congelação de sêmen de carneiro. Holt et al., (1992) observaram em estudo crio-microscópico do espermatozóide de carneiro, que a gema de ovo protege contra danos na membrana e perda da motilidade, induzidas abaixo do ponto de congelação extracelular (-20ºC).

Várias pesquisas têm concluído que a adição de surfactantes ao diluidor com gema de ovo melhora a motilidade do espermatozóide após a descongelação, a integridade acrossomal, a sobrevivência e a fertilidade. El-Alamy & Foote (2001) avaliaram o efeito da adição de 0,5% do surfactante STLS (sodium and triethanolamine lauril sulfato) ao diluidor TRIS – Citrato-Gema, na criopreservação do sêmen de carneiros das raças Finn e Dorset. As

taxas de sobrevivência foram de 71-76% e a motilidade progressiva de 41 - 47% após a descongelação do sêmen, sendo que os ejaculados não tinham sido selecionados antes da congelação. Os resultados foram considerados satisfatórios e os autores concluíram que este diluente pode ser utilizado para a IA cervical de ovinos.

Oliveira et al., (1988) adicionaram OEP (ovus es paste) ao diluente para criopreservação de sêmen de carneiros das raças Corriedale e Ideal e observaram um aumento significativo na integridade acrossomal após a descongelação (76,4 x 66,7% controle) e na motilidade progressiva (55x 48% controle). Além disso, o índice de parição na inseminação artificial cervical, com o sêmen criopreservado na presença de OEP foi superior ao do grupo controle (41,18% x 13,63% controle).

Ao adicionar 0,7% de Equex-STM, ao diluente de Fisher para criopreservação do sêmen de carneiros Assaf, Akourki et al., (2004) observaram que o surfactante proporcionou um aumento significativo na motilidade individual, na viabilidade, na integridade acrossomal e na integridade de membrana plasmática pelo teste hiposmótico.

Na criopreservação do sêmen de bodes, Aboagla & Terada (2004a) utilizaram o diluente Tris-gema (20% gema) aditivado de trealose e do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS), em diferentes concentrações (0,035; 0,05; 0,075; 0,1; 0,15 e 0,2%) e avaliaram o efeito SDS sobre a viabilidade do sêmen descongelado, em termos de motilidade (%), motilidade progressiva (%) e VAP (μm/s). Houve um aumento significativo tanto na motilidade (80,0%) quanto na motilidade progressiva (65%) quando 0,1% de SDS foi usado. No entanto, a porcentagem de acrossomo íntegro foi maior quando 0,05 ou 0,075% de SDS foi usado. Alta concentração de SDS (>0,1%) foi prejudicial tanto à motilidade quanto à integridade acrossomal. Em outro estudo, Aboagla & Terada (2004b) avaliaram a Influência do detergente SDS na integridade acrossomal durante a criopreservação do sêmen de bodes em três diluentes diferentes: TCG (tris-citrato-glicose; sem gema) TCG-Y (Tris-gema) e TCG-YS (Tris-gema + 0,035% de SDS). O sêmen foi congelado em *pellets* e após a descongelação, o sêmen diluído nos diluentes contendo gema (com ou sem SDS) tiveram um percentual de espermatozóide com acrossomo intacto significativamente, mais baixo e uma perda acrossomal mais alta sem,

no entanto diferirem entre si. O SDS não exerceu efeito danoso ao acrossomo comparado ao tris-gema. Portanto, a gema de ovo foi o principal fator prejudicial ao acrossomo do espermatozóide caprino.

Na criopreservação do sêmen de touros, Ahmad & Foote (1986) observaram que a adição de 0.5% STLS (Equex-STM) ao meio Tris gema, não foi prejudicial à motilidade espermática e tendeu a melhorar a porcentagem de espermatozóides móveis e com acrossomos intactos (microscopia contraste de fase) após a descongelação. Ainda no sêmen de touro, Arriola & Foote (1987) avaliaram várias concentrações de STLS (0; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5 e 2,0) adicionadas ao diluente tris-gema, de acordo com o método de glicerolização: em uma etapa a 32°C, em duas etapas: a 32 e a 4°C e com a temperatura de descongelação: 4, 30 e 60°C. A ótima sobrevivência do espermatozóide ocorreu entre 0,5 e 1% de STLS, independente do método de glicerolização. Houve aumento significativo na motilidade e na integridade acrossomal após descongelação, em relação ao controle, quando 0,5 e 1% de STLS foi adicionado e a descongelação ocorreu a 30 e 60°C. A Motilidade na descongelação a 30°C foi de 54% e a 60°C foi de 57% (0,5%STLS) e de 53 e 52%, respectivamente quando 1% de STLS foi utilizado. A integridade acrossomal na descongelação a 30 e 60°C foi de 77,2 e 79% (0,5%STLS) e de 79,1 e 77,3% (1%STLS). A fertilidade, com base no não retorno ao estro após a inseminação artificial, foi significativamente mais alta (70,9%) no grupo inseminado com Tris + 0,5% STLS em relação ao controle (68%). Os autores concluíram que o detergente STLS é benéfico à sobrevivência do espermatozóide de touro congelado quando adicionado ao diluente tris-gema contendo 20% de gema nas concentrações de 0,5 a 1% (v/v) e que a fertilidade do sêmen criopreservado em Tris com 0,5% STLS é normal.

No sêmen de touro Foote & Arriola (1987) avaliaram a sobrevivência e a fertilidade do espermatozóide bovino criopreservado nos diluentes: Tris-gema, leite integral e Tris-gema STLS. A adição de detergente ao diluente à base de leite, sem gema, foi letal ao espermatozóide. A motilidade pós-descongelação foi maior no meio Tris com 0,5% de Equex (68,7%) do que no Tris ou leite (55 e 56,5%, respectivamente). Ao adicionar gema ao diluente à base de leite (0, 10 ou 20%), a motilidade foi maior quando o detergente estava presente no meio com gema (± 54%). A taxa de fertilidade com base no não retorno ao estro foi

maior nos diluidores à base de leite (73,4%) e tris-gema STLS (73,4%) do que nos demais: leite-gema (65,8%), leite-gema-STLS (65,6%) ou Tris-gema (69,5%). Os resultados confirmam o efeito benéfico do detergente quando adicionado ao Tris-gema.

2.3 - Metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS)

Metabólitos reativos do oxigênio (ROS, do termo em inglês: *reactive oxygen species*), radicais livres e oxidantes são termos usados, para identificar os intermediários químicos reativos do metabolismo do oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNÉR, 2001). O termo radical livre não é considerado o mais adequado, pois nem todos os metabólitos reativos do oxigênio são radicais livres. O mesmo se aplica ao termo oxidante, uma vez que algumas ROS (ex. O_2^- e H_2O_2) podem atuar tanto como agentes oxidantes como redutores, em sistemas diferentes. Já o termo, metabólitos reativos do oxigênio (ROS) inclui todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Os ROS são encontrados em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O. Durante esse processo, são formados intermediários reativos como: os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila ($HO_2^\bullet$) e hidroxila ($OH^\bullet$) e, o não radical, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria e a reatividade dos ROS é neutralizada pela entrada de quatro elétrons (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

a) Radical superóxido (O_2^-)

É um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória. É também produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (NORDBERG & ARNÉR,

2001). Sua formação ocorre em quase todas as células aeróbicas e são produzidos durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos e eosinófilos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar membranas lipídicas, agindo, portanto, apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

b) Radical hidroxila (OH°)

É considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outro ROS. É formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^{+}), denominada reação de Fenton (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

O radical hidroxila também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação).

c) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz o OH°; tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001). Uma vez produzido, o H_2O_2 é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes: catalase, glutationa peroxidase e peroxiredutases (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

2.4 Antioxidantes

Segundo Halliwell & Gutteridge, (1999) antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparada àquela do substrato oxidável, retarda ou previne significativamente, a oxidação daquele substrato.

Para proteger-se do efeito letal da formação excessiva de ROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante enzimático e um não enzimático**.** O sistema enzimático é composto pelas enzimas: Superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT), peroxiredoxinas (Prx), glutationa (GSH), glutationa redutase (GR) e glutationa peroxidase (GPx). Fazem parte do sistema não enzimáticos, um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo as vitaminas C e E, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Esse sistema pode atuar em duas linhas: como removedor/varredor do agente antes que ele cause lesão (glutationa reduzida, superóxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase e vitamina E) ou como reparador da lesão ocorrida (ácido ascórbico, GR e GPx) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Com exceção da vitamina E (α-tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

a) Catalase

A catalase é uma heme-proteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular. Também atua na destoxificação de diferentes substratos (ex. fenóis e álcoois), via redução acoplada do peróxido de hidrogênio.

È encontrada no sangue, na medula óssea, nas mucosas, no rim e no fígado.

Um papel antioxidativo da catalase é diminuir o risco de formação do radical hidroxila a partir do H_2O_2 via reação de Fenton. Para aumentar sua eficiência e protegê-la da inativação, a catalase se liga ao NADPH (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Lapointe et al. (1998) detectaram a atividade de catalase no fluido do oviduto de vacas, porcas e mulheres. Ao incubarem espermatozóides bovinos com fluido de oviduto purificado e com catalase de fígado de bovino disponível comercialmente, observaram que somente a catalase presente no fluído oviductual ligou-se ao capuz acrossomal do espermatozóide. A presença de

catalase no trato genital feminino de mamíferos pode ser funcionalmente relevante, uma vez que o espermatozóide dos mamíferos é deficiente em catalase. Além disso, aminoácidos presentes no útero e no oviduto de bovinos estimulam a produção de H_2O_2 pelos espermatozóides mortos. Como o H_2O_2 é um dos principais reagentes envolvidos na reação em cadeia que leva à lipoperoxidação, esta enzima pode ser muito importante para a sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo da fêmea.

Lapointe & Bilodeau (2003) observaram que os níveis de catalase no fluido oviductual de vacas aumentam cerca de duas vezes do inicio ao fim do ciclo estral, principalmente na região da ampola, enfatizando a importância da remoção de H_2O_2 no oviduto.

b) α - Tocoferol (Vitamina E)

Vitamina E é um termo nutricional que se refere a um grupo de tocoferóis e tocotrienóis com atividade antioxidante. Apenas oito moléculas naturais revelam atividade antioxidante: quatro tocoferóis (α, β, γ, δ) e quatro tocotrienóis (α, β, γ, δ) (BRIGELIUS-FLOHÉ & TRABER, 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O α-tocoferol é a forma mais abundante na natureza e a que possui maior atividade biológica (BRIGELIUS-FLOHÉ & TRABER, 1999).

A molécula da vitamina E é dividida em duas partes: um anel cromanol, também chamado de cabeça croman (hidrofílica) e uma cadeia ou cauda de hidrocarbonetos (hidrofóbica), que serve para ancorá-la na membrana lipídica. O grupo –OH presente no anel cromanol é o responsável por sua propriedade antioxidante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A vitamina E é conhecida como o principal antioxidante lipofílico que protege os ácidos graxos poliinsaturados dos tecidos contra a peroxidação. Ela é um potente removedor de radicais peroxil ($LOO^{\bullet}$) e provavelmente, o mais importante inibidor da reação em cadeia da lipoperoxidação em animais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O grupo hidroxila presente no grupo fenólico do anel cromanol rapidamente reage com o radical peroxil ($LOO^{\bullet}$), transferindo para ele o seu átomo de H, convertendo-o em hidroperóxido de lipídio - LOOH (BRIGELIUS-FLOHÉ &

TRABER, 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNÉR, 2001) e um radical tocoferoxyl; um segundo radical peroxil se liga ao radical antioxidante para formar outro hidroperóxido (LOOH) que é um produto não radical (LIEBLER, 1993). Para cada molécula de vitamina E oxidada, dois radicais peroxil são consumidos (LIEBLER, 1993).

No entanto, dependendo dos compostos presentes na reação, a vitamina E pode exercer efeito anti ou pró-oxidativo (BRIGELIUS-FLOHÉ & TRABER, 1999). Segundo Halliwell & Gutteridge, (1999) os tocoferóis podem reduzir Fe(III) a Fe^{2+} e Cu^{2+} a Cu^{+}, que por sua vez, exercem efeito pro-oxidativo. Além disso, o radical tocoferol (α-Toc$^{\bullet}$) oriundo da redução do radical peroxil, pode abstrair hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados, atuando então como um fraco promotor de lipoperoxidação. Estes fenômenos já foram observados em alguns sistemas *in vitro*.

Para Bolle et al., (2002) o uso da vitamina E como terapia antioxidante pode ser considerada uma faca de corte duplo, dependendo rigorosamente da dose ou da concentração *in vitro* da vitamina.

Wang et al., (2002) avaliaram o efeito dose-dependente da vitamina E (Trolox, 100 a 800μmol) no desenvolvimento de embriões de ratos e observaram que em altas concentrações (600 e 800μmol) a vitamina E era tóxica aos embriões.

c) Trolox C (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico)

O 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico, posteriormente designado com o nome de Trolox C (CORT et al., 1975), é um análogo hidrossolúvel do tocoferol que foi sintetizado por Scott e sua equipe em 1974 e indicado como antioxidante para a preservação de óleos e gorduras. Esta substância apresenta propriedades antioxidantes e é eficaz tanto em gordura animal quanto vegetal. Característica, que o torna singular, já que o tocoferol tem pouca atividade na prevenção da peroxidação de óleos vegetais (SCOTT et al., 1974). Sua atividade antioxidante em óleos vegetais e gordura animal é maior que a do α e γ-tocoferol (CORT et al., 1975).

O mecanismo de ação do efeito antioxidante do Trolox é semelhante ao da vitamina E, ou seja, envolve o OH fenólico e a remoção de radicais peroxil (ALBERTINI & ABUJA, 1999).

Sua estrutura é composta por um núcleo croman, semelhante ao do α-tocoferol, e um grupo ácido carboxílico no carbono 2 (Figura 1).

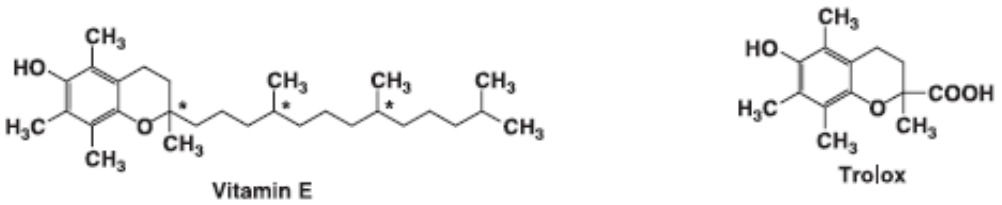


FIGURA 1: Estrutura molecular da Vitamina E (α - tocoferol) e do Trolox C (6-hidroxi-2,5,7,8-tetra-metil-chroman-2-acido carboxílico) Fonte: Rezk et al., (2004)

O interesse por antioxidantes hidrossolúveis origina-se da observação de que a maioria dos ROS (ex. anion superóxido) é gerada dentro da fase aquosa. Apenas os radicais peroxil que não são eliminados pelos antioxidantes hidrossolúveis e que passam para dentro da fase lipídica podem desencadear a peroxidação dos lipídios (Frei et al. 1989 *apud* SAGACH et al., 2002).

Segundo Barclay et al., (1995) o Trolox tem vantagem sobre os outros antioxidantes que são apenas lipossolúveis, como a vitamina E. Devido a sua estrutura cromanol, que lhe dá atividade antioxidante e ao grupo carboxila, que tem moderado efeito hidrossolúvel, o Trolox é distribuído em ambas às fases da bicamada de lipídios das biomembranas, tornando-se um excelente protetor contra a lipoperoxidação. Alem disso, o trolox pode ser adicionado diretamente à membrana lipídica (sistema intacto) sem a necessidade de solventes ou outros métodos de extração. Isto o torna conveniente para estudos em sistemas biológicos naturais.

Wu et al. (1990) observaram que o Trolox protegeu miócitos, hepatócitos e eritrócitos, contra radicais de oxigênio gerados artificialmente. Usando hepatócitos humanos como modelo, os autores exploraram o mecanismo de ação do Trolox na célula e sugerem que o seu comportamento foi consistente

com o esperado para um antioxidante: reduziu o nível de dienos conjugados (produto da lipoperoxidação, marcador de dano oxidativo em hepatócitos humanos) enquanto prolongava a sobrevivência da célula apesar da presença de radicais de oxigênio altamente reativos. Ou seja, atuou como um removedor de radicais de oxigênio.

Sagach et al. (2002) investigaram a atividade antioxidante do Trolox na isquemia/reperfusão cardíaca comparada com o α-tocoferol e observaram que o tratamento com Trolox aumentou significativamente a recuperação cardíaca após isquemia/reperfusão, comparado ao α-tocoferol que foi menos eficaz. Além disso, a produção de TBARS foi significativamente inibida pelo Trolox, sugerindo que o efeito benéfico do mesmo era devido à sua atividade antioxidante.

2.5 ROS, Antioxidantes e Função Espermática

Segundo Halliwell & Gutteridge, (1999) a primeira indicação de que o estresse oxidativo pode afetar a viabilidade e a função do espermatozóide foi obtida em 1943 quando MacLeod observou que o espermatozóide humano rapidamente perdia sua motilidade quando incubado sob elevadas concentrações de O_2 e que a adição de catalase oferecia alguma proteção.

2.5.1 Produção e degradação de ROS no sêmen

A geração de ROS no sêmen é evidente. No entanto, o mecanismo bioquímico responsável pela produção de ROS pelo espermatozóide ainda não está elucidado. Existem evidências da presença de uma oxidase na membrana plasmática do espermatozóide que é ativada para gerar O_2^- (AITKEN, 1995; DE LAMIRANDE et al., 1997). Aitken (1995) sugere que a nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) seja a principal fonte de elétrons responsáveis pela produção de O_2^- pelo espermatozóide humano com o possível envolvimento do sistema NADPH oxidase como acontece em outros tipos de células. A observação por Griveau et al. 1997 *apud* De Lamirande & Gagnon, (1999) de que a adição de NADPH (20mM) causa um aumento na produção de O_2^- e diminuição na motilidade espermática, na hiperativação e na capacitação,

que podem ser prevenidas pela combinação de SOD e CAT, sustentam essa hipótese. Aitken et al. (2003) demonstraram que o espermatozóide humano é uma célula redox ativa que possui diferentes sistemas de transporte de elétrons. Um componente significante dessa atividade é localizado superficialmente e pode ser facilmente removido das células intactas por um simples processo de lavagem (essa atividade aparece no sobrenadante das células lavadas), sugerindo que a atividade redox ocorre na superfície do espermatozóide, o que é consistente com a atividade da enzima de superfície celular NADH oxidase. Em outro estudo com espermatozóides selecionados por gradiente Percoll e livres de contaminação com leucócitos, Aitken & Clarkson (1988) observaram um alto sinal de quimiluminescência espontânea que foi suprimido pela adição de SOD, um removedor de superóxido.

Uma segunda hipótese para a produção de ROS é a diaforase espermática (uma oxidoredutase NADH-dependente) localizada na peça intermediária do espermatozóide e integrada a cadeia respiratória mitocondrial (GAVELLA & LIPOVAC, 1992). Plante et al. (1994) observaram que apenas um terço dos ROS produzidos pelo espermatozóide são liberadas para fora da célula o que os levou a sugerir a predominância da diaforase espermática como sistema gerador de ROS pelo espermatozóide. Estes autores argumentam que se os ROS são gerados dentro da célula, eles têm menores chances de atingir o espaço extracelular do que se eles forem gerados por uma NADPH oxidase na membrana plasmática, a qual libera seus produtos no meio extracelular, como observaram com leucócitos.

No entanto, existe a hipótese do envolvimento de fatores de crescimento ou hormônios na estimulação da produção de ROS pelo espermatozóide (BAKER et al., 2003). De Lamirande e Gagnon, 1995, *apud* Baker et al. (2003) adicionaram soro sanguíneo fetal ultrafiltrado, retirado do cordão umbilical, a espermatozóides humanos fracionados por gradiente Percoll e observaram a estimulação da produção de ROS pelo espermatozóide, sugerindo que o sistema gerador de ROS no espermatozóide pode ser ativado por hormônios ou compostos de baixo peso molecular presentes no soro.

Os ROS são gerados durante o metabolismo celular aeróbico. Os ROS mais comuns gerados pelo espermatozóide são: o **ânion superóxido** (O_2^-) que rapidamente sofre dismutação enzimática pela superóxido dismutase

originando o **peróxido de hidrogênio** (H_2O_2) e o **radical hidroxila** (OH°), formado a partir do H_2O_2 em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^{++}) denominada reação de Fenton (AITKEN, 1995; DE LAMIRANDE & GAGNON, 1999; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNÉR, 2001). O peróxido de hidrogênio é considerado mais tóxico que o O_2^-, por que é mais estável e rapidamente atravessa a membrana plasmática (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNÉR, 2001). No espermatozóide eqüino, o H_2O_2 é a principal ROS responsável pelos danos oxidativos, *in vitro* (BALL et al., 2001).

Dentro do ejaculado existem duas fontes principais de ROS: os espermatozóides e os leucócitos. Ambos possuem um mecanismo similar de geração de ROS, a NADPH localizada na membrana celular. Os leucócitos geram ROS durante a fagocitose e são capazes de gerar 100 vezes mais ROS que as células espermáticas. Por isso, eles representam uma poderosa e potencialmente, perigosa, fonte de ROS e podem ter um efeito prejudicial na função espermática (AITKEN & CLARKSON (1987) *apud* BAUMBER et al., 2002).

Baumber et al., (2002) incubaram espermatozóides de garanhão (25 x 10^6 espermatozóides/ml) a 38°C por 30 minutos, com neutrófilos ativados (0; 0,5 ; 1; 5 e 10 x 10^6/mL) e neutrófilos + catalase (10 x 10^6 neutrófilos/mL + 200U/mL de catalase) e avaliaram a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelo espermatozóide e pelos neutrófilos ativados, bem como, a influência na motilidade espermática. Houve um aumento significativo ($p<0,05$) na geração de H_2O_2 com a adição de 5 e 10 x 10^6 neutrófilos/mL, associado a um decréscimo significativo na motilidade total.

Espermatozóides anormais ou não funcionais parecem gerar maiores quantidades de O_2^- do que aqueles saudáveis. Para Aitken (1995) a formação excessiva de ROS no sêmen pode ser uma conseqüência da infertilidade. Grande quantidade de ROS é observada no sêmen de homens inférteis. Segundo Zini et al., (2000) o plasma seminal de homens inférteis não é deficiente em SOD e /ou catalase. Portanto, o alto nível de ROS presente no sêmen de alguns desses homens se deve à produção excessiva de ROS e não a uma deficiência nas defesas antioxidantes. No garanhão, os

espermatozóides anormais presentes no sêmen geram significativamente, maiores quantidades de H_2O_2 do que os normais (BALL et al., 2001a).

O espermatozóide possui um sistema intracelular de defesa antioxidante contra os ROS, que consiste principalmente de enzimas como: superóxido dismutase (SOD), catalase, glutationa peroxidase e redutase, bem como antioxidantes não enzimáticos como: ácido ascórbico e α-tocoferol (AITKEN, 1995) e extracelularmente, ele é protegido pelo plasma seminal que contém vários redutores de ROS, enzimáticos e não enzimáticos, contribuindo para uma poderosa atividade antioxidante. Estes antioxidantes incluem: ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, SOD, glutationa e outros tióis, taurina, hipotaurina e vitamina E (JÓZWIK et al., 1997; OVERVELD *et al*., 2000; ZINI et al. 2000). Recentemente, Overveld et al., (2000) descobriram que a tirosina, também exerce um papel importante como antioxidante no plasma seminal.

A enzima superóxido dismutase (SOD) presente no citoplasma (Cu, Zn – SOD) e na mitocôndria (Mn-SOD) é responsável pela dismutação de duas moléculas do ânion superóxido em uma de peróxido de hidrogênio. Enquanto que enzimas como a catalase, glutationa peroxidase (GPx) e peroxiredoxinas (Prx) catalisam a redução do H_2O_2 a água e O_2 (NORBERG & ARNÉR, 2001). No entanto, existem paradoxos no que diz respeito à complexa relação entre geração de ROS e sistemas antioxidantes no espermatozóide. Uma das aparentes contradições é que os níveis de catalase são extremamente baixos no espermatozóide enquanto que o H_2O_2 é a ROS na maioria das vezes responsável pelos danos oxidativos (ARMSTRONG et al., 1999; BAUMBER et al., 2000 e 2002; BILODEAU et al., 2001).

No sêmen de homens inférteis Aitken et al., (1996) observaram uma correlação negativa entre a atividade da SOD e vários aspectos da função espermática, incluindo capacidade de fusão espermatozóide-ovócito, morfologia e características de movimento. Nesse estudo, a atividade da SOD foi maior na população de espermatozóides defeituosos, isolada da região de baixa densidade do gradiente de Percoll, do que naquela isolada da região de alta densidade. Além disso, os espermatozóides recuperados da fração de baixa densidade exibiram significativamente, mais altos níveis de lipoperoxidação (9,1 nmol TBARS/10^8 spz) do que os da fração de alta

densidade (2,1 nmol TBARS/10^8 spz) e surpreendentemente, a atividade da SOD nessa população de foi três vezes maior (71,2 U/10^6 spz) do que a observada nos espermatozóides funcionais (26,2 U/10^6 spz). Essa associação entre SOD e função espermática defeituosa, segundo os autores, reflete: a) presença de precursores das células germinativas no sêmen bem como, citoplasma residual nas células espermáticas b) indução direta de lipoperoxidação devido à excessiva produção de H_2O_2 e c) remoção do O_2^- que tem papel biológico importante na capacitação espermática. No sêmen de homens férteis e saudáveis, submetido a estresse oxidativo induzido pela adição de H_2O_2, Misro et al., (2004), também observaram que, a categoria mais afetada pelo estresse oxidativo (pouca resistência) mostrou maior atividade de SOD e Catalase no espermatozóide e plasma seminal, enquanto que o nível de lipoperoxidação no espermatozóide, foi significativamente maior do que no grupo de sêmen com boa capacidade de resistência ao estresse oxidativo.

O sêmen de carneiro contém grande quantidade de SOD e baixas concentrações de GSH, GPx e catalase (Abu-Erreish et al., 1987 *apud* MAXWELL & STOJANOV, 1996; MARTÍ et al., 2003) sendo que suas concentrações podem ser consideravelmente reduzidas pela diluição do sêmen. Além disso, Martí et al., (2003), observaram que a atividade da GR e GPx, que como a catalase são varredores de H_2O_2, variaram significativamente entre amostras (com o tempo de incubação) enquanto que a atividade da SOD permaneceu constante. No espermatozóide de bovinos, os níveis de catalase e GPx também são baixos (BILODEAU et al., 2000) e a SOD parece ser o principal antioxidante enzimático (O'FLAHERTY et al., 2003).

Segundo Aitken (1995), a capacidade biossintética do espermatozóide é limitada, tornando difícil para ele substituir qualquer molécula que tenha sido danificada. Além disso, as enzimas antioxidantes podem estar concentradas na peça intermediária, deixando grande parte da membrana que cobre a cabeça e a cauda menos protegida. Por isso, o plasma seminal é particularmente importante na proteção do espermatozóide contra os danos causados pelos ROS gerados pelo próprio espermatozóide e pelos fagócitos presentes no ejaculado. Overveld et al., (2000) avaliando o potencial antioxidante de cinco compostos presentes no plasma seminal, [ácido ascórbico, ácido úrico, hipotaurina e tirosina (ABTS) e α-tocoferol]. Observaram um contínuo e

relativamente, lento comportamento de captura de radicais. Esses autores especularam que a relativamente, baixa taxa de reação constante com radicais ABTS exerce um papel crucial no comportamento antioxidante destes compostos. Talvez uma complexa reação em cadeia pode estar envolvida, incluindo auto-regeneração de antioxidantes ou formação de radicais intermediários.

Os metabólitos reativos do oxigênio exercem um papel duplo na fertilidade do macho. Uma produção controlada de ROS é de vital importância para a sua função normal enquanto que a superprodução e/ou defesas antioxidantes inadequadas levam a estresse oxidativo, resultando em um impacto negativo na fertilidade (AITKEN, 1995; BLONDIN et al., 1997, *apud* OVERVELD et al., 2000).

2.5.2 ROS e capacitação espermática

Existem evidências de que pequenas quantidades de ROS, como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são necessários para que ocorra a capacitação espermática, hiperativação da motilidade, reação acrossomal e fusão com o ovócito no humano (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1993; AITKEN, 1995), bovino (O'FLAHERTY et al., 2003) e eqüino (BAUMBER et al. 2003).

Visando avaliar o envolvimento do H_2O_2 na capacitação do espermatozóide bovino, O'Flaherty et al., (2003) determinaram sua produção após capacitação induzida por heparina e detectaram níveis significativamente maiores que no controle. No entanto, a adição de catalase ao meio (10, 50 ou 100 μg/mL) não causou variações significativas na porcentagem de espermatozóides capacitados. Isso só foi observado quando 0,5 mg/mL de SOD foi adicionada na presença de 100 μg/mL de catalase indicando que o O_2^- preferivelmente que o H_2O_2 é a espécie ativa envolvida nos mecanismos celulares que levam à capacitação, no espermatozóide bovino.

Baumber et al. (2003) examinaram a influência dos ROS na capacitação do espermatozóide do eqüino. A importância do H_2O_2 ou do O_2^- para a capacitação foi determinada pela adição de catalase (CAT) ou superóxido

dismutase (SOD), respectivamente, contra um controle positivo onde a produção de ROS foi induzida pelo sistema xantina – xantina oxidase (X-XO). Os ROS gerados exógenamente pelo sistema X-XO promoveram a capacitação do espermatozóide eqüino, enquanto que a adição de CAT ou SOD preveniu o aumento no número de espermatozóides vivos com acrossomo reagido. Isso indica a participação tanto do H_2O_2 quanto do O_2^- na capacitação do espermatozóide eqüino. No espermatozóide de homens, Villegas et al. (2003) observaram um efeito dos ROS na capacitação espermática. A incubação de espermatozóides com leucócitos ativados (fonte de ROS) resultou em aumento na capacitação espermática (37% x 19% no controle). Os resultados sugerem que a capacitação do espermatozóide humano pode ser induzida pelos ROS.

No sêmen de bovinos, Beorlegui et al. (1997) observaram que o sêmen do touro que apresentou maior susceptibilidade à lipoperoxidação e menor motilidade espermática possuia menor capacidade de passar pela reação acrossomal, induzida pelo cálcio ionóforo, quando comparada com aqueles com menores níveis de peroxidação dos lipídios. Revelando assim, que a peroxidação de lipídios causa danos à membrana plasmática. Maior capacidade de passar pela reação acrossomal é observada naqueles espermatozóides com maior integridade de membrana plasmática, que possivelmente preservaram sua regularidade funcional.

2.5.3 Danos causados ao espermatozóide pelos ROS

Embora a geração controlada de ROS tenha funções fisiológicas em diferentes tipos de células, altas concentrações, são deletérias as funções celulares, podendo danificar todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. Para proteger-se do efeito deletério dos ROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante. Distúrbios no balanço oxidante – antioxidante, em favor do oxidante, levam ao estresse oxidativo, que em princípio, pode ser causado por redução na quantidade de antioxidantes nos sistemas de defesa celular ou por produção elevada de ROS (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A geração de altas concentrações de ROS no sêmen está associada ao declínio no metabolismo de energia do espermatozóide, na motilidade e na viabilidade espermática e com a fragmentação do DNA em cavalos, touros, carneiros, bodes e homens (ARMSTRONG et al., 1999; KRZYZOSIAK et al., 2000; BAUMBER et al., 2002; BILODEAU et al., 2002; DURU et al., 2000).

Krzyzosiak et al., (2000) observaram um efeito deletério da exposição ao H_2O_2 na motilidade e na viabilidade do espermatozóide bovino durante a incubação à temperatura ambiente por nove dias. Observaram também um aumento na susceptibilidade à desnaturação *in situ*, do DNA espermático.

Baumber et al., (2000) examinaram a influência dos ROS gerados pelo sistema xantina – xantina oxidase (X-XO) sobre a motilidade, a viabilidade, a integridade acrossomal, o potencial de membrana mitocondrial e a peroxidação dos lipídios da membrana do espermatozóide eqüino, incubado por 30 minutos na presença de catalase (150U/mL), SOD (150 U/mL) ou glutationa (1,5 mM). Aos 30 minutos de incubação com o sistema X-XO houve um declínio significativo na MT, VSL, VCL, ALH, LIN e VAP, quando comparado ao controle. A catalase preveniu o decréscimo em todos os parâmetros da motilidade, enquanto que a SOD não. Como o sistema X-XO gera tanto H_2O_2 quanto 0_2^-, a habilidade da catalase, um varredor de H_2O_2, para prevenir o declínio na motilidade, indica que o H_2O_2 é o principal ROS citotóxico para o espermatozóide eqüino. A geração de ROS não teve efeito significativo sobre a viabilidade ou a integridade acrossomal, nem sobre o potencial de membrana mitocondrial ou os níveis de lipoperoxidação. Sendo a motilidade espermática o melhor indicador de estresse oxidativo, nessa espécie.

Baumber et al., (2002) observaram também, uma influência significativa dos ROS gerados por neutrófilos ativados sobre a motilidade do espermatozóide eqüino. Quando o sêmen foi incubado na presença de cinco e 10 x 10^6 neutrófilos/mL, houve um declínio significativo no total de espermatozóides móveis e na motilidade progressiva.

Armstrong et al., (1999) esclareceram que o H_2O_2 é tóxico ao espermatozóide humano e que é responsável pela inibição do movimento espermático e da produção de energia (ATP). Duru et al., (2000) demonstraram que o estresse oxidativo, oriundo da incubação do

espermatozóide de homens com 100 ou 200µM de H_2O_2, resultou em severa perda de motilidade e indução de danos ao DNA.

Bilodeau et al., (2001) adicionaram 100 µM de H_2O_2 ao sêmen de bovino diluído em Tris-gema e observaram um efeito negativo na motilidade espermática. Em estudo posterior, Bilodeau et al., (2002) observaram que o H_2O_2 foi o responsável pela perda da motilidade do espermatozóide bovino, mas não exerceu efeito negativo na viabilidade espermática.

a) Lipoperoxidação

A peroxidação de lipídios é definida como “a deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados”. Ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que contém duas ou mais duplas ligações carbono-carbono ($H_2C=CH_2$), devido a isso, são excelentes alvos para o ataque de radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNÉR, 2001). É uma reação em cadeia que passa pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A iniciação da lipoperoxidação é causada pelo ataque a um lipídio por qualquer ROS que tenha reatividade suficiente para seqüestrar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (- CH_2-). O seu término ocorre quando os radicais lipídicos e peroxila (R–C$^{\bullet}$ e –ROO$^{\bullet}$) produzidos propagam-se até destruírem a si próprios. O radical hidroxila é reconhecido como a espécie iniciadora da peroxidação (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A membrana que rodeia as células e as organelas celulares contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, por isso ela é um dos componentes celulares mais atingidos pelos ROS, em decorrência da peroxidação dos lipídios. Esse processo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Há perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A técnica mais comum usada para medir a lipoperoxidação é o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), que é um método espectrofotométrico que mede a concentração dos produtos oriundos da peroxidação dos lipídios. Durante a fase de iniciação da lipoperoxidação ocorre acúmulo de hidroperóxidos de lipídios na membrana espermática, que se decompõe formando vários aldeídos, entre eles o malonaldeído. O produto final medido é o malonaldeído (MDA) ou substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico -TBARS (JENTZSCH et al., 1996; SHARMA & AGARWAL, 1996; LAPENNA et al., 2001; DOTAN et al., 2004; SANOCKA & KURPISZ, 2004).

A peroxidação dos lipídios parece ser uma causa particularmente, importante de disfunção espermática. Os lipídios da membrana espermática são ricos em ácidos graxos poliinsaturados, os quais conferem a fluidez necessária para que ocorram os eventos de fusão de membranas associados com a fertilização. No espermatozóide oxidado, ocorre diminuição da fluidez da membrana, aumento da permeabilidade e diminuição da capacidade de fertilização (AITKEN, 1995; DE LAMIRANDE & GAGNON, 1999). Além disso, existe uma relação entre a lipoperoxidação no sêmen com a motilidade e morfologia espermática, sendo que a mesma pode ser controlada ou mesmo revertida pelo uso de antioxidantes no meio diluidor.

No sêmen de homens férteis e inférteis, os espermatozóides defeituosos ou menos resistentes ao estresse oxidativo apresentam níveis de lipoperoxidação mais altos que o observado nos espermatozóides funcionais (AITKEN et al., 1996; MISRO et al., 2004). Aitken et al. (1993a) mediram os níveis de lipoperoxidação no sêmen de homens e correlacionaram os resultados com a morfologia espermática, as características do movimento e a capacidade de fusão espermatozóide-ovócito. As células espermáticas oriundas da fração de baixa densidade de Percoll (espermatozóides anormais e mortos) produziram três vezes mais malonaldeido (MDA) que aquelas da fração de alta densidade ($12,8 \pm 2,1$ versus $4,4 \pm 1,1$nmol MDA/10^8 spz). A alta produção de MDA pela população espermática recuperada da fração de baixa densidade foi associada a uma redução na porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais e de células móveis. A geração de malonaldeído foi negativamente correlacionada com diversos parâmetros da motilidade espermática, entre eles: porcentagem de células rápidas; porcentagem de

células móveis; VAP, VSL e VCL e com a habilidade do espermatozóide de passar pela fusão esperma-ovócito. Engel et al., (1999) mediram a lipoperoxidação espontânea e induzida por ferro em amostras de sêmen de homens andrologicamente normais e observaram que os espermatozóides que apresentam uma baixa capacidade de manutenção da motilidade progressiva são mais susceptíveis ao processo de lipoperoxidação (46,9 x 72,0 nmol MDA/10^9 células, grupo normal x baixa SEM).

Griveau et al. (1995) observaram que o sistema xantina-xantina oxidase induz lipoperoxidação da membrana dos espermatozóides de homens, uma vez que os níveis de hidroperóxidos de lipídios e a degradação de PUFAS foram maior em relação ao controle. Concluíram ainda, que tanto o H_2O_2 quanto o O_2^- estavam envolvidos na iniciação da lipoperoxidação, desde que a adição de catalase ou SOD ao sistema evitou a degradação dos PUFAS da membrana.

No sêmen de touros, Beorlegui et al., (1997) observaram uma alta correlação negativa entre a produção de TBARS e a motilidade espermática. As amostras de sêmen com menor motilidade e vigor apresentaram maior susceptibilidade a lipoperoxidação (4,95 $\pm$ 0,31 nmol TBARS/10^8 espermatozóides e 0,34 $\pm$ 0,81 nmol TBARS, respectivamente). Além disso, os espermatozóides que apresentaram maior susceptibilidade à lipoperoxidação e menor motilidade apresentaram também menor capacidade de passar pela reação acrossomal, induzida pelo cálcio ionóforo. Demonstrando assim, que a peroxidação de lipídios causa danos à membrana plasmática, uma vez que maior capacidade de passar pela reação acrossomal é observada naqueles com maior integridade de membrana plasmática, que possivelmente preservaram sua regularidade funcional.

Kasimanickam et al. (2006) avaliaram os níveis de lipoperoxidação no espermatozóide e no plasma seminal de cordeiros com exame andrológico satisfatório, questionável e insatisfatório. No grupo de animais com exame andrológico insatisfatório, a produção de MDA tanto no plasma seminal quanto no espermatozóide foi significativamente maior do que nos outros grupos, enquanto que a porcentagem de células morfologicamente normais e com motilidade progressiva foi menor. O nível de MDA no plasma e no

espermatozóide foi negativamente correlacionado com a motilidade e a morfologia espermática.

No sêmen de carneiros incubados a 37°C por 120 minutos, no meio Tris-gema com ou sem antioxidantes, Sarlos et al. (2002) observaram um aumento na concentração de MDA nas amostras controle (sem antioxidante) durante o período de incubação, enquanto que nas amostras com antioxidante, exceto para a vitamina E, os níveis de MDA se mantiveram mais baixos e semelhantes, no mesmo período. No grupo controle, a concentração de MDA foi de 25,89; 36,91 e 49,57 nmol MDA/10^9 espermatozóides, aos 30, 60 e 120 minutos de incubação, respectivamente. Nas amostras contendo o antioxidante Resveratrol, os níveis de MDA foram: 3,69; 3,74 e 3,74 nmol MDA/ 10^9 espermatozóides, nos tempos acima mencionados. Ainda no sêmen de carneiros, Aisen et al. (2005) determinaram os níveis de lipoperoxidação no espermatozóide criopreservado em diluente Tris (isotônico) e Tris+trealose (hipertônico) e observaram que imediatamente após a descongelação não houve diferença significativa nos níveis de TBARS entre as células espermáticas criopreservadas nos dois diluidores. No entanto, após 3h de incubação a 37°C os níveis de peróxidos de lipídios foram mais baixos nos espermatozóides criopreservados no diluidor com trealose. Ao avaliarem apenas o diluente, os níveis de TBARS também foram maiores no diluidor Tris (2,14 nmol TBARS/mL) do que no Tris+trealose (1,61 nmol TBARS/mL).

No sêmen de varrão incubado por cinco dias em meio com ou sem vitamina E (α-tocoferol), Ceroline et al., (2000) observaram que houve incorporação do α-tocoferol à membrana espermática e sua relação com uma grande redução na susceptibilidade à lipoperoxidação. No quinto dia de incubação, a quantidade de MDA no grupo controle foi de 28,6 μg MDA/10^9 espermatozóides, significativamente maior que do no grupo tratado (6,5 μg MDA/10^9 spz).

Neild et al. (2002) avaliaram a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática do espermatozóide de garanhões utilizando a sonda fluorescente C11B-FA, que produz fluorescência verde na membrana após a peroxidação e observaram que a lipoperoxidação ocorreu principalmente na peça intermediária.

2.5.4 Uso de antioxidantes no diluidor e seu efeito na viabilidade espermática

A adição de antioxidantes ao diluente tem sido avaliada quanto à sua capacidade de proteger o espermatozóide do efeito tóxico dos metabólitos reativos do oxigênio.

Os antioxidantes presentes no plasma seminal normalmente ajudam a proteger o espermatozóide dos danos oxidativos, mas a lavagem do sêmen pode remover esta capacidade protetora, principalmente se houver contaminação com íons de metais de transição (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Além disso, os níveis de antioxidantes presentes normalmente no sêmen ainda são parcialmente removidos com a diluição do sêmen o que pode reduzir consideravelmente o efeito benéfico do antioxidante natural. Assim, a adição destes agentes, mesmo em pequenas concentrações, pode melhorar a função espermática do sêmen manipulado.

Existem relatos de que a adição de antioxidantes ao diluente melhora a motilidade e a viabilidade do espermatozóide bovino (KRZYZOSIAK et al., 2000; BILODEAU et al., 2002), eqüino (BAUMBER et al., 2002), ovino (MAXWELL & STOJANOV, 1996; UPERTI et al., 1998) e ainda, a capacidade fertilizante (*in vitro*) do espermatozóide ovino (MAXWELL & STOJANOV, 1996). Sendo que a maioria dos estudos acima relacionada foi feita com sêmen armazenado na forma líquida e o estresse oxidativo é muito maior após a criopreservação. Portanto, vale conferir os efeitos desse antioxidante na preservação da função espermática após o processo de criopreservação.

Aurich et al., (1997) trabalhando com sêmen de garanhão diluído em leite desnatado ou glicina e resfriado a 5ºC, avaliaram o efeito da catalase e do ácido ascórbico na motilidade e na integridade da membrana do espermatozóide. A adição de ácido ascórbico resultou em um aumento na porcentagem de espermatozóides com membrana íntegra, nos dois diluidores, enquanto que a catalase não exerceu nenhuma influência nesse parâmetro nos dois diluidores. A motilidade também não foi influenciada pelos dois antioxidantes em qualquer dos diluidores. Ainda no sêmen de garanhões,

resfriado a 5ºC, Ball et al., (2001), avaliaram o efeito da catalase, BHT[1], Vitamina E, Vitamina C, tempo[2], trolox[3] e BSA[4] na manutenção da motilidade espermática. Não foi observada nenhuma melhora significativa na motilidade com a adição desses antioxidantes. Já Baumber et al. (2002) observaram um efeito benéfico da adição de catalase ao diluidor, no sêmen de eqüinos. A catalase reduziu significativamente ($P<0,05$), a geração de H_2O_2 pelos neutrófilos ativados e preveniu o declínio no total de espermatozóides móveis. No entanto, não exerceu nenhuma influência no declínio da motilidade progressiva. Os autores concluíram que em garanhões com uma capacidade antioxidante do plasma seminal reduzida ou com alta contaminação por neutrófilos, as defesas antioxidantes podem ser melhoradas com a adição de catalase. Por outro lado, as observações clínicas sugerem que raramente, são observados neutrófilos nestas concentrações ($5x10^6$/mL) em amostras de sêmen, conseqüentemente a infiltração normal de neutrófilos parece não possuir um perigo para a função espermática de garanhões.

Krzyzosiak et al., (2000) também observaram um efeito benéfico da adição de catalase ao diluente, na sobrevivência, na motilidade e na viabilidade do espermatozóide bovino. Bilodeau et al., (2002) observaram que a adição de pequenas quantidades de catalase (1 a 5 U/mL) era suficiente para proteger o espermatozóide bovino dos danos causados pelo H_2O_2 à sua motilidade.

Bilodeau et al., (2001) avaliaram o efeito dos tióis: glutationa, cisteína e 2-mercaptoetanol, na prevenção da perda de motilidade do espermatozóide bovino, criopreservado em diluidor à base de tris-gema, na presença ou ausência de estresse oxidativo (100 μM de H_2O_2). Todos os tióis, em concentrações acima de 0,5 mM, mantiveram a motilidade espermática alta por seis horas na ausência de fonte externa de H_2O_2. Entretanto, quando foi adicionado ao diluente 100 μM de H_2O_2, foi necessário 1mM de cada tiol para proteger efetivamente a motilidade espermática por 6 horas. Esses pesquisadores concluíram então, que o efeito deletério da criopreservação utilizando Tris-gema na motilidade espermática pode ser controlado pela adição desses tióis ao diluidor em concentrações de 1mM.

---

[1] Hidroxitolueno Butilatado
[2] 2,2,6,6-tetrametilpeperidina-1-oxil
[3] 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico (análogo hidrosolúvel da vitamina E)

Foote et al., (2002) avaliaram o efeito da adição de glutationa, superóxido dismutase, ácido ascórbico, hipotaurina, tempo e tempol[5] ao diluente à base de leite integral e glicerol, sobre a motilidade e a fertilidade do espermatozóide bovino. Esses antioxidantes não exerceram nenhum efeito benéfico na motilidade ou na fertilidade, o que foi atribuído à presença de um antioxidante natural abundante no leite, a caseína, que já exerce essa função no diluente estudado.

Trabalhando com sêmen de carneiros na forma líquida, Sarlos et al., (2002) avaliaram o efeito dos antioxidantes: acetato de α-tocoferol, glutationa peroxidase, aromex[6], resveratrol[7] e da associação de resveratrol + vitamina E ou resveratrol + aromex, na motilidade e integridade das membranas espermáticas. Estes autores observaram que a adição de antioxidantes prolonga o período de conservação do sêmen, melhora a motilidade do espermatozóide e reduz o grau de danos celulares. Maxwell & Stojanov (1996) também observaram efeito semelhante da adição de antioxidantes ao sêmen ovino diluído em Tris[8]. Eles avaliaram o efeito da adição de catalase, superóxido dismutase, citocromo c e glutationa peroxidase ao diluidor, sobre a viabilidade espermática. Todos os antioxidantes foram hábeis em melhorar tanto a sobrevivência quanto à integridade acrossomal do espermatozóide durante a estocagem do sêmen na forma líquida. Já Uperti et al., (1997) não observaram nenhum efeito benéfico da adição de antioxidantes (vitamina E, BHA[9], n-propil galato, Desferal[10] e catalase) ao diluidor na manutenção da motilidade do espermatozóide de carneiros incubados a 38 ºC, atribuindo o resultado a um efeito antioxidante do próprio diluente utilizado, que foi o RSD-1(diluente quimicamente definido para sêmen ovino).

No sêmen ovino congelado com diluente a base de Tris–gema, com e sem glicerol, Sánchez-Partida et al., (1997) avaliaram o efeito de compostos oriundos do epidídimo (taurina, hipotaurina e inositol) e antioxidantes (carnosina e ácido ascórbico) na motilidade e na fertilidade do espermatozóide.

---

[4] Albumina Sérica Bovina
[5] 4-hidroxi- 2,2,6,6,-tetrametilpeperidina
[6] antioxidante sintético
[7] 3,4',5-trihidroxi-estilbeno
[8] Tris (hidroximetil) aminometano
[9] hidroxianisole butilatado

Somente a taurina exerceu efeito positivo na motilidade espermática, tanto na presença quanto na ausência de glicerol. No entanto, apesar da melhora na motilidade espermática, a fertilidade do sêmen congelado na presença de taurina (50 mM) não diferiu da observada no sêmen congelado sem taurina. Isso indica que outros fatores além da motilidade estão envolvidos na capacidade fertilizante e na função do espermatozóide criopreservado.

No sêmen congelado de bodes, Sinha et al., (1996) observaram um efeito benéfico da adição de glutationa ao diluente à base de Tris. Houve aumento na motilidade e na diminuição da porcentagem de anormalidades acrossomicas no sêmen descongelado. A taxa de fertilidade do sêmen congelado na presença de glutationa foi maior, mas não significativamente, do que aquela observada para o sêmen congelado apenas em Tris.

2.6 Avaliação da Fertilidade do Sêmen

Tradicionalmente, o diagnóstico de fertilidade de um macho era feito de acordo com a avaliação descritiva do sêmen, com ênfase no número de espermatozóides presentes no ejaculado, sua motilidade e sua morfologia. No entanto, muitos estudos têm demonstrado que esse conceito é falho e, na realidade, não é o número de espermatozóides móveis ou morfologicamente normais que determina a fertilidade e sim, sua competência funcional. Com base nessa visão, tem sido desenvolvido um grande número de testes para avaliar vários aspectos da função espermática e predizer a capacidade fertilizante do espermatozóide *in vitro* e *in vivo*, com certo grau de precisão. Dentre esses testes podemos incluir os que avaliam as características do movimento espermático, o potencial de membrana mitocondrial, a integridade de membrana plasmática e acrossomal, a capacidade de penetração no muco cervical, a capacitação e reação acrossomal, o reconhecimento da zona pelúcia, a fusão espermatozóide-ovócito, o grau de estresse oxidativo sofrido pelo espermatozóide e a integridade do seu DNA.

Está claro que somente a motilidade espermática não é adequada para explicar as diferenças entre a fertilidade dos machos. Em adição a este teste,

---

[10] mesilato de deferoxamina

o espermatozóide deve também ser capaz de se ligar à zona pelúcida, sofrer a reação acrossomal, penetrar na zona pelúcida, ligar-se à membrana do ovócito, ativá-lo e iniciar o seu desenvolvimento. A deficiência em alguma dessas etapas reduz a fertilidade (CORREA et al., 1997; MILLER et al., 1998).

Vários ensaios são desenvolvidos para avaliar diferentes parâmetros funcionais do espermatozóide, como: quantidade de ATP, penetração no muco cervical, penetração no ovócito, integridade da membrana e atividade da acrosina. Porém, estes testes, geralmente consomem tempo, requerem mais equipamentos e tem limitações na aplicação a campo. Os problemas de aplicabilidade das provas estão relacionados à repetibilidade do teste de qualidade do sêmen, relação entre as características quantitativas e qualitativas na dose inseminante, manipulação do sêmen e sua possível injúria, viabilidade no trato genital feminino, fertilização e desenvolvimento embrionário (CORREA et al., 1997).

Ainda falta um consenso dos testes laboratoriais para avaliar a verdadeira fertilidade do espermatozóide. Porém, encontrar um método de acurácia para predizer a fertilidade no macho está perto de sua realização. Os testes de volume, motilidade, concentração e morfologia espermática têm valores limitados para a fertilização. As provas de capacitação, reação acrossomal e fertilização *in vitro*, têm melhores considerações na correlação para a fertilidade (WHITHFIELD & PARKINSON, 1995; MILLER et al., 1998).

A morfologia espermática normal tem sido demonstrada ser um bom indicador da fertilidade, entretanto os métodos para a realização destas análises têm sido baseados na avaliação subjetiva e a variação entre técnicos e laboratoristas na porcentagem de espermatozóides normais é alta (BAKER & CLARKE, 1987). Este tipo de variação faz com que a acurácia na interpretação dos dados se torne extremamente difícil.

Para reduzir a variação introduzida por métodos analíticos, o desenvolvimento de acurácia, objetividade e repetibilidade são importantes. Nesse sentido, foi desenvolvido um método de análises da morfometria da cabeça do espermatozóide, automatizado por computador (ASMA). Este sistema realiza a mensuração da morfometria da geometria da cabeça do espermatozóide, através da análise computadorizada de imagens de espermatozóides. O sistema se mostra acurado, preciso e com repetibilidade.

Além disso, o sistema ASMA é totalmente automatizado, permitindo assim a objetividade na análise (GRAVANCE et al., 1995).

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozóides também é de grande importância, devido ao fato da cinética espermática ser relevante na determinação do potencial de fertilidade do espermatozóide. Dentre esses parâmetros, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com a penetração no muco cervical, penetração em ovócitos de hamster e resultados de fertilização *in vitro* (JANUSKAUSKAS et al., 1999).

Kolibianakis et al., (1992) estudaram a relação entre a motilidade espermática analisada por computador e a forma convencional. A análise computadorizada mostrou-se altamente correlacionada com o método convencional. Sendo que, a faixa de concentração espermática ótima das amostras para análise foi de 50 x 10^6 células/mL. Concluíndo, que a análise computadorizada da motilidade pode ser uma alternativa rápida, objetiva e confiável para a avaliação rotineira de amostras de sêmen.

A integridade acrossomal é um parâmetro importante na morfologia espermática e no processo de criobiologia. Por isso, vários testes foram desenvolvidos visando a avaliação conjunta da viabilidade espermática e da integridade acrossomal (GRAHAM et al., 1990; TAO et al., 1993; MAXWELL & JOHNSON, 1997; MAXWELL et al., 1997).

Provas rápidas e exatas são importantes no estudo da viabilidade espermática para determinar a qualidade do sêmen. Podem ser utilizadas as colorações supra-vitais, também conhecidas como coloração de vivos e mortos, como a eosina, nigrosina ou azul de anilina, que consistem na habilidade discriminatória das células com membranas funcionalmente intactas, de excluir os corantes dos compartimentos nucleares do espermatozóide (GARNER et al., 1986). Mais recentemente, colorações fluorescentes tem sido utilizadas individualmente ou em combinação para estudar algumas funções da célula espermática (HARRISON & VICKERS, 1990; GARNER & JOHNSON, 1995; MAXWELL et al., 1997; SUKARDI et al., 1997; VALCÁRCEL et al., 1997; JANUSKAUSKAS et al., 1999).

Os corantes fluorescentes proporcionam avaliações mais objetivas das células espermáticas em relação aos métodos clássicos com microscopia ótica

(GRAHAM et al., 1990). As células espermáticas coradas com fluorescência podem ser avaliadas tanto quanto aos aspectos morfológicos como os funcionais, sem interferência do meio extracelular (ERICSSON et al., 1989) e a combinação de vários corantes possibilita a avaliação de diversos parâmetros celulares simultaneamente (GRAHAM et al., 1990; ERICSSON et al., 1993; TAO et al., 1993; MAXWELL et al., 1997).

Segundo Januskauskas et al., (1999), a integridade da membrana plasmática pode ser avaliada com a coloração dupla de membrana com o corante ácido nucléico permanente (SYBR -14), combinado com o corante iodeto de propídio (IP), pela técnica de citometria de fluxo ou microscopia epifluorescente. Esses pesquisadores avaliaram a integridade de membrana pelas duas técnicas e não encontraram diferença significativa entre os dois métodos e concluíram que, esta é uma técnica rápida e precisa de avaliação do estado funcional do espermatozóide.

Ainda, a fluoresceína conjugada à lecitina (*Pissum sativum agglutin* - FITC/PSA) pode mostrar a coloração seletiva do acrossomo no bovino em quatro padrões: vivo com o acrossomo intacto, morto com o acrossomo intacto, vivo com reação acrossomal e morto com reação acrossomal (JANUSKAUSKAS et al., 1999).

Sukardi et al., (1997) utilizaram, em sêmen ovino pela primeira vez, a combinação dos fluoróforos FITC-PSA e o IP para testar sua eficiência na avaliação da integridade do acrossomo e na viabilidade de espermatozóides tratados com cálcio ionóforo A23187 para a indução da reação de acrossomo. Segundo os autores, ao microscópio de fluorescência, essa combinação de duas sondas fluorescentes possibilitou a fácil visualização da integridade do acrossomo e da viabilidade espermática. Os resultados mostraram quatro categorias de células: 1 - PSA positivo e IP negativo (acrossomo intacto em célula viva); 2 - PSA positivo e IP positivo (acrossomo intacto em célula morta); 3 - PSA negativo e IP negativo (acrossomo danificado em célula viva); 4 - PSA negativo e IP positivo (acrossomo danificado em célula morta). Concluíram então, que essa combinação é adequada para avaliar simultaneamente, integridade acrossomal e viabilidade espermática, porque ambos os fluoróforos são excitados a um mesmo comprimento de onda (488nm), tornando o exame simples em um microscópio de fluorescência comum.

Com o objetivo de avaliar o efeito da congelação sobre a viabilidade espermática e a integridade do acrossomo de carneiro, Valcárcel et al., (1997) compararam a eficiência de três lecitinas fluorescinadas associadas ao corante H258. As lecitinas fluorescinadas utilizadas foram: as aglutininas do *Pisum sativum* (PSA), do *Arachis hypogea* (PNA) e do *Triticum vulgaris* (WGA). A avaliação foi realizada em microscopia de epifluorescência e os resultados foram comparados com os encontrados em microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). As colorações foram facilmente identificadas por seus padrões distintos de distribuição. Espermatozóides intactos corados com PSA ou PNA apresentaram fluorescência no segmento equatorial, não fluorescendo na região da cabeça. Na coloração com WGA, os espermatozóides com acrossomo intacto apresentaram-se de duas formas: fluorescência em toda a região da cabeça, sendo mais intensa na porção anterior, ou fraca fluorescência apenas na região acrossomal. Os espermatozóides com perda do acrossomo não apresentaram fluorescência nessa região, sendo observada fraca fluorescência somente na região posterior. Não houve diferença significativa ($P > 0,001$) entre os procedimentos de coloração avaliados, indicando que os mesmos são eficientes na monitoração da integridade acrossomal após a criopreservação em espermatozóides de carneiro.

Para avaliação da integridade da membrana em espermatozóides de ovinos e suínos com o auxílio de microscopia de epifluorescência, Harrison e Vickers (1990) utilizaram diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e IP como sondas fluorescentes e obtiveram os seguintes resultados: para cada 100 espermatozóides de suínos contados, 76,5 ± 5,5 foram considerados intactos pela utilização do CFDA isoladamente, 80,3 ± 5,7 foram tidos como intactos usando apenas o IP e 78,3 ± 4,6 pelo uso dos dois corantes associados. O mesmo procedimento foi realizado em amostras de espermatozóides de ovinos, com resultados similares, indicando a repetibilidade do processo. No geral foram encontradas duas populações de células: intactas (coradas com CFDA e não coradas com PI) ou danificadas (parcialmente coradas, ou não coradas com CFDA e coradas com PI).

O diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) possui baixo peso molecular, o que possibilita sua passagem através da membrana plasmática celular. Esta substãncia é hidrolisada por esterases, resultando em carboxifluoresceína livre, a qual permanece retida no interior da célula quando a membrana plasmática está intacta, fluorescendo em verde. O IP é um análogo do brometo de etídio, o qual passa através da membrana celular danificada e se liga ao DNA e RNA, produzindo fluorescência vermelha no núcleo de células mortas. O IP é excluído de células intactas e mostra-se muito efetivo na identificação de células não viáveis (JONES & SENFT, 1985).

Garner & Johnson (1995) conduziram um experimento com a finalidade de testar os fluocromos SYBR-14 e o IP para diferenciar os espermatozóides vivos dos mortos em uma variedade de mamíferos (bovinos, suínos, ovinos, rato, coelho e homem). Três populações celulares foram identificadas: espermatozóides vivos (corados com SYBR-14, exibindo fluorescência verde); espermatozóides mortos (corados com IP, fluorescendo em vermelho) e espermatozóides danificados (com dupla coloração).

Logo que o espermatozóide atravessa a barreira cervical e penetra na cavidade uterina ele inicia o processo de capacitação. Em termos biológicos, a capacitação pode ser vista como um processo pelo qual o espermatozóide atinge um nível de elevada susceptibilidade aos sinais provenientes do complexo cummulus-ovócito (AITKEN, 2006).

A ligação do espermatozóide à zona pelúcida do ovócito, desencadeia a reação acrossomal (AR), um processo de exocitose que resulta na liberação de enzimas proteolíticas que facilitam tanto a penetração do espermatozóide na zona pelúcida quanto remodelam a superfície do espermatozóide em preparação para a fusão com o ovócito (AITKEN, 2006). É possível medir a condição do acrossomo do espermatozóide usando lecitinas fluorescentes que se ligam à membrana acrossomal externa (*Arachis hypogaea* aglutinina) ou ao conteúdo acrossomal (*Pisum sativum* aglutinina). Estas sondas produzem uma marcação uniforme do capuz acrossomal nas células não AR e uma banda fluorescente ao redor do segmento equatorial da cabeça do espermatozóide, quando ocorreu reação acrossomal (AITKEN, 2006).

A coloração do espermatozóide com clortetraciclina fluorescente (CTC) é utilizada para visualizar o processo de capacitação e a reação acrossomal após a resfrigeração e congelação (JANUSKAUSKAS et al., 1999).

O ATP produzido pelas mitocôndrias, localizadas na peça intermediária, serve como suplemento energético para os batimentos flagelares, sendo, portanto, indispensável para que haja motilidade espermática (JONES, 1998).

Uma das formas de se medir a função mitocondrial é detectando o potencial de membrana mitocondrial. Essa avaliação pode ser realizada através do uso de sondas fluorescentes. A Rodamina 123 (R123), um corante fluorescente catiônico que tem sido usado em vários tipos de células incluindo os espermatozóides de carneiro (WINDSOR & WHITE, 1995; WINDSOR, 1997; GILLAN & MAXWELL, 1999) para indicar o potencial de membrana mitocondrial, no entanto, ela não é adequada para distinguir entre mitocôndrias com alto e baixo potencial de membrana. Já o corante lipofílico catiônico, JC-1 (iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianina) possui a habilidade de diferenciar as mitocôndrias coradas com alto ou baixo potencial de membrana. Na mitocôndria com alto potencial de membrana, o JC-1 forma multímeros de J-agregados que emitem fluorescência vermelho-alaranjada. Enquanto que nas mitocôndrias com baixo potencial de membrana, o JC-1 forma monômeros que emitem fluorescência verde (REERS et al., 1991).

Usando o fluocromo rodamina 123 (R123) que se acumula na mitocôndria de espermatozóides com atividade respiratória, Gillan & Maxwell (1999) observaram que a respiração mitocondrial do espermatozóide descongelado de carneiros diminui mais rapidamente do que em espermatozóide fresco sobre um período de incubação de 6 horas a 37°C. Windsor & White (1995) observaram que o processo de congelação e descongelação provocou uma redução na captação de R123 pelo espermatozóide de carneiros, indicando baixa atividade mitocondrial, que parece ter sido causada por lise na membrana mitocondrial. Isto é aparente na rápida liberação da R123 previamente acumulada pelo espermatozóide descongelado, comparada com a liberação mais lenta observada no espermatozóide submetido ao choque térmico (resfriamento rápido a 5 ou 10°C). O dano á membrana mitocondrial ocorreu como conseqüência da

congelação/descongelação e não do resfriamento lento de 30 a 5°C, em aproximadamente 2,5 horas. Também usando R123, Windsor (1997) observaram o efeito da crioinjúria na respiração mitocondrial e demonstraram que a respiração mitocondrial é importante para o espermatozóide ovino ser capaz de atravessar a cérvice.

Usando o JC-1 para avaliar, por meio da citometria de fluxo, a função mitocondrial do espermatozóide ovino descongelado, Martinez-Pastor (2004) obtiveram um percentual de células com alto potencial de membrana mitocondrial que variou de 17,4 a 31,4%, havendo diferença significativa entre os carneiros (P<0,01).

Para atender aos objetivos do trabalho, foram delineados dois experimentos, sendo o primeiro para avaliar o efeito da adição de um surfactante ao diluidor, sobre a viabilidade espermática *in vitro*, durante o processo de criopreservação e eleger o de melhor desempenho para ser utilizado no segundo experimento. O experimento 2 foi delineado para avaliar o efeito da adição de dois antioxidantes ao meio diluidor, sobre a geração de radicais livres e viabilidade do sêmen ovino criopreservado.

Para melhor compreensão do leitor, cada um dos experimentos será descrito em um capitulo, incluindo o material e métodos, os resultados, a discussão, e as conclusões.

3. HIPÓTESE

A adição de surfactantes e antioxidantes ao diluente, em baixas concentrações, não prejudicará o processo de capacitação espermática e acarretará melhora na viabilidade do sêmen ovino criopreservado.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar o efeito de diluentes de diferentes composições sobre a congelação de sêmen ovino, buscando dar uma melhor proteção ao espermatozóide contra o choque térmico, bem como, melhorar a viabilidade espermática pós criopreservação.

4.2 Específicos

Avaliar o efeito da adição de surfactantes e antioxidantes ao diluidor na sobrevivência, motilidade espermática e integridade de membranas do espermatozóide ovino criopreservado;

Avaliar a integridade da membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial e o estádio de capacitação do espermatozóide de carneiro, no sêmen descongelado, por meio de sondas fluorescentes;

Quantificar a produção de peróxido de hidrogênio e de superóxido e os níveis de lipoperoxidação no sêmen ovino criopreservado e nos diluentes estudados;

Correlacionar os dados de produção de radicais livres, com a integridade da membrana plasmática e acrossomal, e análise computadorizada da motilidade.

5- EXPERIMENTO 1

EFEITO DA ADIÇÃO DE LAURIL SULFATO DE SÓDIO (OEP) AO DILUIDOR SOBRE A CINÉTICA E A INTEGRIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES EM SÊMEN OVINO CONGELADO

5.1 Materiais e Métodos

5.1.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Laboratório do Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN), instalações do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), situados no município de Botucatu, Estado de São Paulo.

5.1.2 Animais Experimentais e Colheita do sêmen

Foram utilizados dez carneiros da raça Santa Inês, com idade entre 12 e 32 meses e andrológicamente aptos, conforme proposto por Fonseca et al. (1992). De cada carneiro foram coletados dois ejaculados, por meio de vagina artificial.

5.1.3 Avaliações do Sêmen Pré-Criopreservação

Após a colheita, o sêmen era mantido em banho-maria a 32°C e imediatamente avaliado quanto ao aspecto, volume, concentração e motilidade espermática. Eram também retiradas amostras para posterior avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal. O aspecto e o volume foram avaliados diretamente no copo coletor; a concentração espermática foi avaliada em câmera de Neubauer; a motilidade espermática foi avaliada pelo sistema de avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA); a

análise de integridade das membranas espermáticas pelo método de fluorescência e a análise da morfologia espermática em microscopia óptica de contraste de fase, sob imersão (aumento de 1000x).

Avaliação da concentração espermática

Para avaliação da concentração espermática, o sêmen foi diluído na proporção de 1:400. Para isso, uma alíquota de 10μL de sêmen era diluída em 4mL de água e em seguida, procedia-se à leitura em câmera de Neubauer, sob microscopia óptica comum em aumento de 200x.

Avaliação computadorizada da motilidade espermática

Uma alíquota de sêmen (10μL) diluída em 500μL de tampão Tris foi submetida à avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA) (Hamilton Thorn Motility Analyser – IVOS 10), em câmara de MAKLER *(Makler Counting Chamber)* aquecida a 37°C, usando para ajuste do aparelho os valores: *frame rate:* 60Hz, *frame acquire:* 30; *minimum contrast:* 56, *minimum cell size:* 5, *médium VAP:* 80, *low* VAP: 30, *low* VSL:20, *non motile head size:* 3, *non motile head intensity:* 50. Em cada amostra foram avaliados três campos escolhidos aleatoriamente e medidos os seguintes parâmetros da motilidade: motilidade total (MT, %); motilidade progressiva (MP, %); velocidade de trajeto (VAP, μm/s); velocidade curvilinear (VCL, μm/s), velocidade progressiva (VSL, μm/s), linearidade (LIN, %) e amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm).

Avaliação das membranas plasmática e acrossomal

A Integridade das membranas plasmática e acrossomal foi avaliada através de coloração fluorescente utilizando-se a mistura de corantes: iodeto de propídio[11] (IP) e diacetato de carboxifluoresceína[12] (DIC) segundo HARRISON & VICKERS (1990). Alíquotas de 10μL de sêmen diluído em

[11] IP (SIGMA-ALDRICH 28,707-5)

tampão Tris, era adicionado a 40µL do meio de coloração (20µL de formol salina tamponada, 20µL de DIC e 10µL de IP em 1mL de citrato de sódio a 2,94%) e incubado, por no mínimo, 15 minutos a temperatura ambiente. Para a análise, 10µL dessa suspensão era depositado entre lâmina/lamínula e observado em microscópio de epifluorescência[13], com o filtro de excitação (BP) 450-490nm, espelho dicromático 510nm e filtro de supressão (LP) 515nm no aumento 40x. Foram avaliadas 200 células/lâmina. Os espermatozóides corados foram classificados em quatro grupos (Tabela 1):

TABELA 1: Classificação dos espermatozóides de acordo com a coloração fluorescente emitida na combinação das sondas: iodeto de propidio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC)

CATEGORIA	DESCRIÇÃO	SIGLA
1	Acúmulo de DIC (fluorescência verde) ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de IP (fluorescência vermelha);	IM1
2	Acúmulo de DIC (fluorescência verde) na região acrossomal e na peça intermediária e de IP na cabeça	IM2
3	Acúmulo de DIC (fluorescência verde) somente na peca intermediária e acúmulo de IP (fluorescência vermelha) na cabeça;	IM3
4	Sem acúmulo de DIC em qualquer parte e acúmulo de IP na cabeça e flagelo	IM4

Fonte: Harrison & Vickers (1990). IM: integridade de membrana

Avaliação da integridade acrossomal

A integridade acrossomal foi determinada por meio de microscopia de contraste de fase em câmara úmida. Uma alíquota de sêmen (10µL) era fixada em 500µL de citrato de sódio com formol (96mL de citrato de sódio 2,94% com

[12] DIC (SIGMA Chemical – P4170 USA)
[13] Leica DM LB, Germany.

4mL de formol comercial). Uma gota da suspensão era colocada entre lâmina e lamínula e avaliada em microscópio de contraste de fase (1000x) sob imersão. Em cada amostra eram avaliadas 200 células.

5.1.4 Diluição e Criopreservação do Sêmen

Após as avaliações, os ejaculados com no mínimo 70% de motilidade eram processados para a criopreservação. Para isso, o ejaculado foi dividido em quatro frações e diluído com os seguintes meios (ANEXO 1):

- **TRIS** - TRIS-glicose-gema (pH: 7,15, Osmolaridade: 365mOsm)
- **TRIS 0,5** - TRIS aditivado com 0,5% de OEP[14] (pH: 7,18; Osmolaridade: 360mOsm).
- **TRIS 1**- TRIS aditivado com 1,0% de OEP (pH: 7,18; Osmolaridade: 371mOsm).
- **GGL** - glicina gema leite (pH: 7,08; Osmolaridade: 301mOsm).

A diluição foi feita a 32°C em duas etapas, de forma a se obter uma concentração de $400x10^6$ espermatozóides/mL. Na primeira diluição, acrescentou-se a fração não glicerolizada de cada diluente e em seguida a fração glicerolizada, de modo que a concentração final de glicerol foi a metade daquela encontrada no meio II de cada diluente. O sêmen era cuidadosamente misturado e envasado, à temperatura ambiente e em seguida, submetido à refrigeração e congelação. O envase foi feito em palhetas[15] de 0,25mL lacradas com álcool polivinílico.

A congelação foi realizada em uma maquina com sistema automatizado de refrigeração e congelação (modelo Tetakon® -TK 3000,TK Tecnologia em congelação Ltda), composto de uma unidade de monitoramento e refrigeração, um cilindro porta-palhetas e uma caixa plástica térmica, recipiente de N_2L.

As palhetas foram acondicionadas no cilindro porta-palhetas em posição vertical, conforme instruções do fabricante, e submetidas ao processo de refrigeração e congelação na curva P3.S2. Nessa curva, a refrigeração do sêmen de 32°C a 5°C ocorreu a uma taxa de 0,5°C/min atingindo os 5°C após

[14] Orvus® Es Paste (sodium lauryl sulfate), Procter & Gamble.

58 minutos de refrigeração, sendo mantido nessa temperatura até completar 90 minutos de processamento.

A partir daí, o cilindro era colocado na caixa contendo nitrogênio líquido, no volume indicado pelo fabricante e iniciava-se o processo de congelação, o qual foi realizado em duas fases: a primeira, de 5°C a –85°C, a uma taxa de -15°C/min e a segunda, de –85°C a –120°C, a -10°C/min.

Após atingir os -120°C, as palhetas eram retiradas da máquina e colocadas diretamente no nitrogênio líquido (–196°C), distribuídas em raques e armazenadas em botijão criobiológico, até a avaliação.

FIGURA 2: Sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen - (a) partes integrantes do sistema, (b) acondicionamento das palhetas no cilindro, (c) fase de refrigeração e (d) fase de congelação.

[15] Paillette 0,25mL- TOP BULL STRAW, Transparente – IMV Technologies (REF: 017011)

5.1.5 Avaliações do Sêmen Pós-descongelação

Para avaliação do sêmen criopreservado, foram descongeladas, em banho-maria a 40°C por 20 segundos, duas palhetas de sêmen de cada carneiro e tratamento, sendo uma de cada repetição.

Após a descongelação, o sêmen era depositado em um micro tubo[16] e uma alíqouta de 15µL de sêmen era diluída em 100µL de tampão TRIS e mantida em banho-maria a 32°C por 5 minutos. Em seguida procedia-se a avaliação computadorizada da motilidade, integridade de membranas e integridade acrossomal, como descrito para o sêmen fresco. Foi também retirada uma amostra para a avaliação do estádio de capacitação espermática.

Avaliação do estádio de capacitação espermática

Amostras de sêmen contendo 24 x 10^6 espermatozóides foram diluídas em 1,0mL de PBS pré-aquecido à 37°C e submetidas à centrifugação (900xg) por 4 minutos para remoção do plasma seminal ou do meio diluidor. Após remoção cuidadosa do sobrenadante, o *pellet* foi re-suspenso com 150 µL de PBS e uma alíquota de 10 µL foi misturada a 10µL de solução recém preparada de CTC[17] (1mM), composta de 20mM de Tris, 130mM de NaCl e 5mM de L-Cisteína[18]. A mistura foi homogeneizada vagarosamente por 20 segundos e foi adicionado 10µL de solução com 1% de glutaraldeído, preparada em 2M de Tris e corrigida com HCl para pH 7.8. Uma amostra de 10 µL desta suspensão foi colocada sobre lâmina aquecida a 37°C misturando-se sobre a mesma 10 µL de solução com 0,22 M de 1,4-diazabicyclo [2 2 2] octano (DABCO)[19] preparada em meio composto de PBS e Glicerol na proporção de 1:9. A mistura foi coberta com lamínula, comprimida firmemente com papel absorvente para remover o excesso de fluido, selada com esmalte incolor e mantida a 4°C protegida da luz para ser realizada a leitura até 1 hora

[16] Microtubes MCT-150-C, 1,5mL Clear, Axygen Scientific INC
[17] CTC (SIGMA –C4881)
[18] L-Cisteína (SIGMA –C7352)
[19] DABCO – SIGMA, D2522

depois. A contagem das células foi realizada sob óleo de imersão e aumento de 1000x em microscópio com iluminação epifluorescente (Excitação BP 450-490 e Supressão LP515). Um total de 100 células por cada lâmina foi contado sendo os espermatozóides classificados em 3 categorias: F - espermatozóides não capacitados com acrossomo intacto; B – espermatozóides capacitados com acrossomo intacto; AR – espermatozóides com acrossomo reagido.

5.1.6 Taxa de Degradação da Motilidade (TDM)

A perda de motilidade causada pela criopreservação foi estimada tomando-se como base à média da motilidade total observada no sêmen fresco (motilidade inicial - MI), partindo-se de todas as amostras que foram processadas e a motilidade média obtida em cada tratamento após a descongelação (motilidade final – MF), conforme a equação:

$$\mathbf{TDM = (MI - MF \times 100) \times MI^{-1}}$$

5.1.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com cinco tratamentos (fresco, congelado em 4 diluentes) e 10 blocos (carneiros). Foram processados dois ejaculados de cada carneiro. Para análise dos dados utilizou-se a média dos valores obtidos nas duas amostras avaliadas. O efeito dos tratamentos sobre os parâmetros da motilidade espermática, integridade de membranas e integridade acrossomal foi avaliado através da análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Duncan a $P<0,05$. Para a análise de capacitação espermática, foi avaliado apenas o efeito do sêmen criopreservado nos quatro diluidores (4 tratamentos) sobre as categorias da capacitação. Será realizada

também a análise de correlação linear entre os estádios de capacitação e a motilidade espermática e integridade de membranas plasmática e acrossomal.

TABELA 2: Esquema da Análise de Variância – Experimento 1

FONTE DE VARIAÇÃO	GL
TOTAL	49
TRATAMENTO	4
BLOCO	9
RESÍDUO	36

5.2 Resultados

Os resultados da avaliação do sêmen ovino congelado nos diferentes diluidores serão apresentados nas Tabelas 3 a 6.

Os valores de F da análise de variância e seus respectivos níveis de significância, referentes aos parâmetros da cinética espermática, integridade de membranas (IM) e integridade acrossomal (ACROS) são apresentados nos Anexos 2.1 e 2.2. Observou-se um efeito significativo dos blocos, representados aqui pelos carneiros doadores de sêmen, na motilidade espermática total e progressiva, nos parâmetros da cinética espermática (VAP, VCL, VSL) e na integridade acrossomal. De um modo geral, alguns carneiros foram superiores a outros em quase todos os parâmetros espermáticos analisados, demonstrando diferenças individuais na congelabilidade do sêmen. Essas diferenças refletiram a heterogeneidade do grupo de animais escolhidos de forma aleatória sem prévia seleção quanto à congelabilidade do sêmen. Foi observado efeito significativo dos tratamentos em todos os parâmetros da cinética espermática e na integridade de membrana plasmática.

5.2.1 Avaliação Computadorizada da Motilidade Espermática

A motilidade espermática avaliada pelo sistema computadorizado (CASA) foi negativamente afetada pela criopreservação, com o sêmen fresco apresentando uma motilidade total (93,7±0,7%) significativamente maior ($P<0,05$) do que após a criopreservação. A motilidade espermática total (MT) no sêmen criopreservado foi significativamente maior ($P< 0,05$) nas amostras congeladas no meio Tris aditivado com OEP: TRIS 1 e TRIS 0,5 (69,9 e 64,9%, respectivamente) que nas amostras congeladas em TRIS (34,3%) e GGL (35,8%, Tabela 3, Figura 3).

A preservação da motilidade total foi melhor ($P< 0,05$) nos diluidores TRIS com 1 e 0,5% de OEP, do que nos outros dois. O percentual de perda da motilidade após a criopreservação, denominado taxa de degradação da motilidade (TDM) foi de 25,4% no diluidor TRIS 1; 30,7% no TRIS 0,5; 62,0% no GGL e 63,5% no TRIS (Figura 3).

TABELA 3- Médias ± erro padrão dos parâmetros da cinética espermática: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e linearidade (LIN) obtidos pelo sistema de análises computadorizada da motilidade espermática (CASA) no sêmen ovino fresco e congelado nos diluidores GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1.

PARÂMETRO		**SÊMEN DESCONGELADO**			
	SF	**GGL**	**TRIS**	**TRIS 0,5**	**TRIS 1**
MT (%)	93,7±0,7^{a}	35,8±3,8^{c}	34,3 ± 2,5^{c}	64,9±3,7^{b}	69,9±5,0^{b}
MP (%)	55,4±2,0^{a}	23,2 ± 2,8^{c}	24,4 ± 1,9^{c}	38,9 ± 2,6^{b}	39,1±3,6^{b}
VAP (µm/s)	158,0±6,0^{a}	126,6±3,5 ^{b}	116,1±3,6 ^{c}	121,3±3,7^{bc}	120,4±3,4^{bc}
VSL (µm/s)	115,2±4,4^{a}	111,3±3,6^{ab}	102,5±3,4^{bc}	96,6±3,1^{c}	92,0±3,3^{c}
VCL (µm/s)	286,5±12,1^{a}	192,7±4,5^{bc}	187,5±5,0^{c}	214,6±7,1^{b}	210,9±6,5^{b}
ALH ((µm)	10,4±0,4^{a}	6,8±0,2^{c}	6,6±0,2^{c}	8,6±0,2^{b}	8,1±0,3^{b}
LIN (%)	41,2±1,1^{d}	59,4±1,4^{a}	56,1±0,7^{b}	46,8±0,8^{c}	45,3±0,5^{c}

Média seguida de letras diferentes na mesma linha diferem entre si a P< 0,05 pelo teste Duncan.
SF: sêmen fresco; GGL: diluidor glicina-gema-leite; TRIS: diluidor Tris-glicose-gema; TRIS 0,5: diluidor Tris-glicose-gema com 0,5% de OEP; TRIS 1: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP.

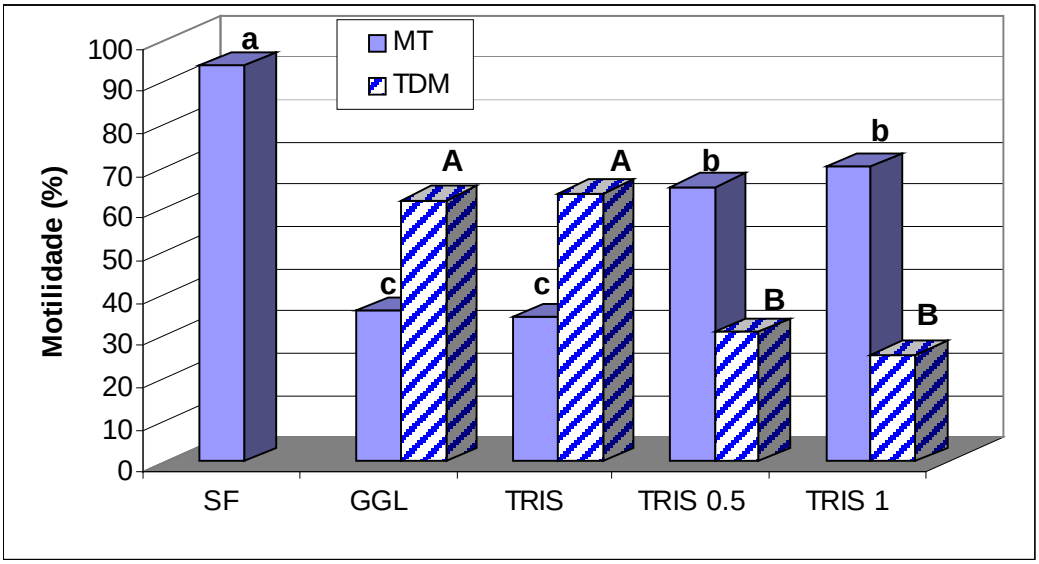


FIGURA 3 - Motilidade Total (MT, média ± ep) estimada pelo sistema CASA e Taxa de Degradação da Motilidade (TDM), para o sêmen ovino fresco (SF) e criopreservado com os diluidores: GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1

A motilidade progressiva (MP) comportou-se de maneira semelhante a motilidade total, sendo significativamente maior (P<0,05) no sêmen congelado nos meios TRIS 1 (39,1%) e TRIS 0,5 (38,9%) que nas amostras congeladas no TRIS (24,4%) e GGL (23,2%, Tabela 3).

Os resultados das velocidades espermáticas analisadas pelo sistema CASA, também são apresentados na Tabela 1. Das três velocidades (VAP, VSL e VCL), os espermatozóides congelados no diluidor GGL apresentaram valores mais altos de VAP e VSL do que nos demais diluidores. A velocidade de trajeto (VAP) foi significativamente maior (P<0,05) nas amostras congeladas no meio GGL (126,6 μm/s) e menor no meio TRIS (116,1 μm/s). Já nos diluidores TRIS 1 e TRIS 0,5, os espermatozóides apresentaram velocidades intermediarias (120,4 e 121,2 μm/s, respectivamente) semelhantes tanto ao maior quanto ao menor valor observado. A velocidade progressiva (VSL) também foi maior (P<0,05) nos espermatozóides congelados no meio GGL (111,3 μm/s). No entanto, foi menor no meio TRIS 1 (92,0 μm/s) que nos demais. Já na velocidade curvilinear (VCL), os espermatozóides criopreservados nos meios TRIS 1 e TRIS 0,5 foram os que apresentaram os maiores valores (211,0 e 214,6 μm/s, respectivamente) enquanto que o menor valor foi observado no TRIS e semelhante ao GGL (P<0,05).

A amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) foi maior (P<0,05) nos espermatozóides recém colhidos (10,4μm) que após a criopreservação. Após a descongelação, o ALH foi maior nos espermatozóides criopreservados nos meios TRIS 0,5 e TRIS 1 (8,6 e 8,1μm, respectivamente) do que naqueles congelados no TRIS (6,6μm) e GGL (6,8μm, Tabela 3).

A linearidade (LIN) dos espermatozóides no sêmen fresco (41,2%) foi inferior (P<0,05) àquela observada no sêmen criopreservado em qualquer um dos diluidores. No sêmen criopreservado, a linearidade foi significativamente maior (P<0,05) nos espermatozóides congelados no diluidor GGL (59,4%) que naqueles congelados nos diluidores com Tris. Os diluidores TRIS 1 e TRIS 0,5 foram os que apresentaram os menores valores de linearidade, sendo de 46,8% para o TRIS 0,5 e de 45,3% para o TRIS 1 (Tabela 3).

5.2.2 Avaliação da Integridade de Membrana Plasmática e Acrossomal

Os percentuais de espermatozóides com acrossomos intactos foram de 95,2% para o sêmen fresco e variou de 88,2 a 90,7% no sêmen descongelado (Tabela 4) havendo influência significativa da criopreservação sobre esta característica. No sêmen criopreservado, não houve diferença significativa (P>0,05) entre diluidores, no percentual de células com acrossomo intacto.

Os percentuais de membrana plasmática intacta detectada pela associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC) são apresentados na Tabela 4 e Figura 4 e a ilustração das categorias observadas é apresentada na Figura 5. Pode-se observar que houve efeito significativo da criopreservação sobre as membranas espermáticas. O percentual de células apresentando membrana plasmática intacta (IM1) no sêmen fresco foi de 70,0±2,3% e caiu para 20,5; 13,9; 28,8 e 32,4% no sêmen criopreservado em GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1, respectivamente (Figura 4). A queda no percentual de células com membrana intacta em relação ao sêmen fresco foi de 70,7% (GGL), 80,2% (TRIS), 58,9% (TRIS 0,5) e 54,3% (TRIS 1).

Não foram observados espermatozóides na categoria IM4 (sem acúmulo de DIC em qualquer parte e acúmulo de IP na cabeça e flagelo).

TABELA 4 – Média ± erro padrão da porcentagem de espermatozóides ovino com acrossomo íntegro (ACROS) em microscopia de contraste de fase e Integridade de membrana plasmática e acrossomal em microscopia de fluorescência usando a combinação das sondas iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC) - IM1: membrana plasmática e acrossomal íntegras; IM2: membrana plasmática danificada e membrana acrossomal intacta; IM3: membrana plasmática e acrossomal danificada, no sêmen fresco e congelado nos diluidores GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1.

PARÂMETRO		**DILUIDOR**			
	SF	**GGL**	**TRIS**	**TRIS 0,5**	**TRIS 1**
ACROS (%)	95,2±1,3[a]	90,7±1,3[b]	90,3±1,3[b]	88,2±1,3[b]	90,2± 1,3[b]
IM1 (%)	70,0±2,3[a]	20,5±2,3[c]	13,9±2,3[d]	28,8±2,3[b]	32,4±2,3[b]
IM2 (%)	16,9±1,7[d]	40,4±1,7[a]	38,0±1,7[a]	29,8±1,7[b]	22,8±1,7[c]
IM3 (%)	13,0±2,4[c]	39,1±2,4[b]	48,1±2,4[a]	41,4±2,4[ab]	44,9±2,4[ab]

Média seguida de letras diferentes na mesma linha diferem entre si a P< 0,05 pelo teste Duncan.
SF: sêmen fresco; GGL: diluidor glicina-gema-leite; TRIS: diluidor Tris-glicose-gema; TRIS 0,5: diluidor Tris-glicose-gema com 0,5% de OEP; TRIS 1: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP.

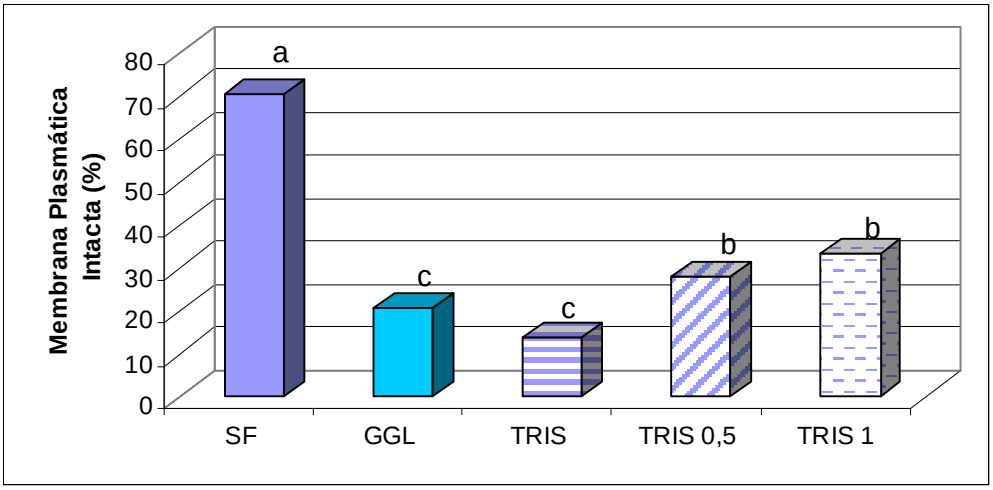


FIGURA 4 - Integridade de membrana plasmática (IM1, média ± ep) estimada pelo método de fluorescência (IP + DIC), para o sêmen ovino fresco (SF) e criopreservado com os diluidores GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1.

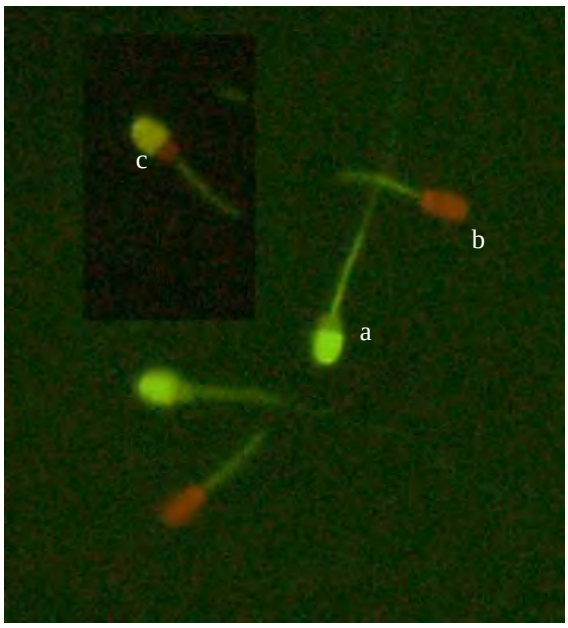


FIGURA 5 - Integridade de membrana plasmática e acrossomal pela associação das sondas fluorescentes IP + DIC: (a) espermatozóide com membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial intactas, (b) espermatozóide com membrana plasmática e acrossomal lesadas e mitocondrial intacta, (c) espermatozóide com membrana plasmática lesada e membrana acrossomal e mitocondrial intacta.

5.2.3 Avaliação do Estádio de Capacitação Espermática

Os percentuais de células não capacitadas, capacitadas com acrossomo intacto e capacitadas com acrossomo reagido no sêmen criopreservado, detectadas pela técnica da clortetraciclina (CTC), são apresentados na Tabela 5. Nota-se que o percentual de espermatozóides não capacitados (categoria F) foi significativamente maior (P<0,05; Anexo 2.3) no sêmen criopreservado nos diluidores a base de Tris (TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1) que no GGL. Já o percentual de espermatozóides capacitados com acrossomo intacto (B) foi maior (P<0,05) no GGL que nos demais diluidores, sendo que no diluidor TRIS e TRIS 1 foram observados os menores percentuais de células nessa categoria. No que diz respeito ás células com acrossomo reagido (AR), o sêmen criopreservado no diluidor TRIS 1 apresentou resultado significativamente maior (P<0,05) que os observados nos demais diluidores, e GGL, TRIS e TRIS 0,5 foram semelhantes entre si.

TABELA 5: Percentual de espermatozóides (x±ep) ovinos não capacitados (F), capacitados com acrossomo intacto (B) e acrossomo reagidos (AR) após criopreservação nos diluidores GGL, TRIS, TRIS 0,5 e TRIS 1.

CATEGORIAS	GGL	TRIS	TRIS 0.5	TRIS 1
F	28,0±4,6^{b}	44,3±4,6^{a}	40,8±4,6^{a}	45,8±4,6^{a}
B	63,2±4,6^{a}	46,7±4,6^{bc}	50,5±4,6^{b}	40,3±4,6^{c}
AR	10,5±1,7^{b}	9,8±1,7^{b}	9,8±1,7^{b}	15,0±1,7^{a}

Média seguida de letras diferentes na mesma linha diferem entre si a P< 0,05 pelo teste Duncan.
SF: sêmen fresco; GGL: diluidor glicina-gema-leite; TRIS: diluidor Tris-glicose-gema; TRIS 0,5: diluidor Tris-glicose-gema com 0,5% de OEP; TRIS 1: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP.

Os parâmetros da motilidade espermática: MT, MP, VCL, VSL, ALH e LIN correlacionaram-se positivamente com o percentual de espermatozóides não capacitados (F) e negativamente com o percentual de espermatozóides capacitados com acrossomo intacto (B). Não foi observada nenhuma correlação entre a porcentagem de espermatozóides com acrossomo reagido e os parâmetros da motilidade espermática.

O percentual de espermatozóides não capacitados (F) mostrou uma correlação positiva com o percentual de espermatozóides com membrana

plasmática e acrossomal intactas (IM1) e uma alta correlação negativa com o percentual de espermatozóides com membrana plasmática danificada e membrana acrossomal e mitocondrial intactas (IM2). Enquanto que o percentual de espermatozóides capacitados com acrossomo intacto (B) correlacionou-se positivamente com o percentual de espermatozóides com membrana plasmática danificada e membrana acrossomal e mitocondrial intactas (IM2), ou seja, quanto maior o percentual de espermatozóides capacitados com acrossomo intacto, maior o percentual de espermatozóides na categoria IM1 de integridade de membrana.

Os espermatozóides na categoria AR (capacitados com acrossomo reagido) apresentaram uma correlação significativa apenas com IM1 e IM2 (Tabela 6).

TABELA 6: Coeficiente de correlação linear (r) entre os estádios de capacitação espermática: F (não capacitados), B (capacitado com acrossomo intacto) e AR (acrossomo reagidos) e os parâmetros da motilidade espermática (CASA) e integridade de membrana (IP+DIC) do espermatozóide ovino criopreservado.

VARIÁVEIS	F	B	AR
MT	0,42**	-0,46***	0,28
MP	0,48***	-0,51***	0,24
VCL	0,42**	-0,40**	0,03
VSL	0,47**	-0,40**	-0,04
ALH	0,45**	-0,50***	0,22
LIN	0,41**	-0,33*	-0,07
STR	0,27	-0,15	-0,17
IM1	0,34*	-0,43**	0,36**
IM2	-0,63***	0,66**	-0,36*
IM3	0,24	-0,15	-0,11

*P<0,05 **P<0,01 ***P<0,001

5.3 Discussão

A criopreservação provocou diminuição na motilidade e nas velocidades espermáticas avaliadas pelo sistema computadorizado, bem como, danos na membrana plasmática e na membrana acrossomal do espermatozóide ovino, quando comparado com o sêmen fresco. O efeito deletério da criopreservação na estrutura da membrana plasmática e na função do espermatozóide de mamíferos já foi relatado nas mais diferentes espécies (HOLT et al., 1992; PARKS & GRAHAM, 1992; MAXWELL & WATSON, 1996; BAILEY et al., 2000; WATSON, 2000). Enquanto que seu efeito deletério sobre a motilidade e velocidades do espermatozóide ovino, avaliadas pelo sistema computadorizado, foi observado por Moses et al., (1995).

O declínio na motilidade é uma característica do espermatozóide criopreservado (Watson, 2000) e é decorrente do estresse da criopreservação. Para proteger o espermatozóide do efeito danoso da criopreservação, recorre-se à adição de crioprotetores ao diluente. Os crioprotetores comumente utilizados nos diluidores para congelação de sêmen ovino são o glicerol e a gema de ovo. A gema de ovo protege espermatozóide de carneiro contra a perda de motilidade durante a criopreservação (Holt et al., 1992 *apud* Holt, 2000) e ocorre uma ampla variação nas concentrações utilizadas nos diluentes para congelação de sêmen ovino. No entanto, alta concentração de gema não necessariamente resulta em uma maior preservação da motilidade. Gil et al., (2003) observaram que o aumento na concentração de gema (acima de 5%) no diluidor à base de Leite não melhorou a motilidade pós-descongelação.

Segundo Salamon & Maxwell (2000) o nível de glicerol adicionado aos diluentes para criopreservação do sêmen de carneiro é limitado devido a sua toxicidade e a concentração que proporciona uma melhor taxa de sobrevivência pós-descongelação está entre 4-6%. Concentrações acima de 6% são prejudiciais à sobrevivência, porque o glicerol penetra mais facilmente no espermatozóide do carneiro. Vários estudos demonstram que a adição de glicerol nas concentrações de 3 a 7% em diluidores contendo de 5 a 20% de gema de ovo proporciona boa taxa de recuperação da motilidade (44 a 85%) pós-descongelação do espermatozóide ovino (MOSES et al., 1995; GIL et al., 2000; EL-ALAMY & FOOTE 2001; ANEL et al., 2003; GIL et al., 2003).

A motilidade total (MT) e a motilidade progressiva (MP) dos espermatozóides criopreservados nos diluentes contendo detergente, TRIS 0,5 e TRIS 1, foi superior à observada no TRIS ou no GGL. O efeito benéfico da adição de detergente ao diluente para criopreservação de sêmen sobre a motilidade do espermatozóide, após a descongelação é relatado na espécie ovina (OLIVEIRA et al., 1988; EL-ALAMY & FOOTE 2001; AKOURKI et al., 2004), bovina (AHMAD & FOOTE, 1986; ARRIOLA & FOOTE, 1987; FOOTE & ARRIOLA, 1987) e caprina (ABOAGLA & TERADA, 2004a). A causa da diferença na crio-susceptibilidade do espermatozóide no GGL em relação ao TRIS 0,5 e TRIS 1 pode ser atribuída à pouca proteção conferida pela gema de ovo à célula espermática durante a congelação no GGL, uma vez que os três diluidores: contêm detergente; a concentração de gema é igual (20%); a concentração de glicerol está dentro dos limites recomendados para o sêmen ovino (5% no GGL) e acima dos níveis máximos recomendados, nos diluidores TRIS 0,5 e TRIS 1 (7%); o método de glicerolização (a 32°C) foi o mesmo em todos os diluidores, portanto o tempo de exposição ao glicerol antes da congelação, que pode aumentar o seu efeito citotóxico sobre os espermatozóides, foi igual para todos. Restando supor que a gema de ovo não conferiu uma proteção adequada à célula espermática durante a congelação no GGL. Salamon & Maxwell (2000) relatam que a gema de ovo tem um efeito maior sobre o espermatozóide bovino que sobre o espermatozóide ovino. Somando-se a essa característica da espécie, mais uma causa para o baixo efeito da gema de ovo sobre os espermatozóides criopreservados no GGL, pode ser atribuída à menor concentração de detergente utilizada nesse diluidor. Isso pode ter causado uma menor solubilização dos componentes ativos da gema no GGL levando a uma menor capacidade de proteção contra a perda de motilidade durante a criopreservação e de maneira semelhante, a ausência de detergente no caso do TRIS sem OEP.

A MT dos espermatozóides criopreservados nos diluentes TRIS 0,5 e TRIS 1 também foi superior àquela observada para espermatozóide ovino criopreservado no diluidor glicina gema-leite (RODELO, 2006) e no Tris-gema, sem detergente (SALAMON & MAXWELL, 1995), porém inferior à obtida por Gil et al. (2003) em um diluente a base de leite.

Os valores obtidos para as velocidades espermáticas (VAP, VCL e VSL) em todos os tratamentos foram superiores aos obtidos por Moses et al., (1994), Bag et al., (2002a, b) e Anel et al., (2003) e inferiores aos obtidos por Gil et al., (2003), todos para sêmen ovino congelado. Possivelmente, essa diferença entre os resultados se deva à variação observada nos parâmetros utilizados para o ajuste do aparelho, ou à influência dos meios diluidores utilizados, diferentes em cada um deles.

Após a criopreservação do sêmen, observou-se um aumento na linearidade (LIN) do espermatozóide criopreservado em todos os diluidores. Uma possível explicação para esse aumento na linearidade seria que a criopreservação causou danos à estrutura flagelar fazendo com que a célula perdesse seu padrão típico de movimento. Segundo Watson (1995) durante a criopreservação ocorre a ruptura entre os elementos do axonema da cauda do espermatozóide e isso pode não só reduzir o número de espermatozóides móveis, mas também afetar o tipo de motilidade. No entanto, esta explicação não justifica o resultado semelhante relatado por Sousa (2002) para o sêmen fresco de carneiros, o qual observou um aumento na linearidade logo após a diluição do sêmen com o diluidor glicina gema leite (GGL) que foi atribuida á presença da glicina no diluidor. No entanto, esse comportamento foi observado no espermatozóide criopreservado em todos os diluidores avaliados nesse estudo. Assim, pode-se dizer que outros fatores alheios ao meio diluidor interferiram nessa variável ou que pode ser uma característica do espermatozóide ovino.

O processo de criopreservação causou um efeito deletério à integridade da membrana plasmática e acrossomal do espermatozóide ovino, quando comparado com o sêmen fresco. O percentual de células viáveis (membrana plasmática e acrossomal intactas – IM1) no sêmen fresco foi superior ao observado por Marti et al. (2006) e semelhante ao observado por Harrison & Vickers (1990) e Sousa (2002) no sêmen fresco diluído em GGL. No entanto, após a criopreservação houve uma queda significativa no percentual de espermatozóides nessa categoria, em todos os tratamentos, demonstrando que a membrana plasmática do espermatozóide ovino é susceptível à crioinjúria.

Notou-se também um aumento no percentual de espermatozóides com membrana acrossomal e mitocondrial intacta e membrana plasmática danificada (IM2), fato também observado por Medina (1995), porém em menor proporção (5,6% no sêmen fresco e 7,04% no sêmen congelado) e a ausência de espermatozóides com membrana mitocondrial lesada (IM4) demonstrando que a membrana plasmática do espermatozóide ovino é mais frágil, ou mais susceptível, à crioinjúria do que a membrana acrossomal externa e a membrana mitocondrial. Observou-se ainda, uma alta correlação positiva entre o percentual de espermatozóides na categoria IM2 com o percentual de espermatozóides capacitados com acrossomo intacto (B), fato que nos chamou a atenção para a possibilidade da classificação IM2 pela associação IP+DIC, ser um indicativo da população de espermatozóides capacitados, ao invés de apenas espermatozóides mortos sem degeneração acrossomal. Essa hipótese baseia-se no fato de que durante a capacitação ocorre uma permeabilização da membrana plasmática, devido a eventos como efluxo de colesterol e remoção de fatores decapacitantes (YANAGIMACHI, 1994; GILLAN et al., 2004), o que pode ter proporcionado a penetração do IP na célula.

Um dos fatores responsáveis pela ocorrência da crioinjúria é a alteração de volume pelo qual a célula passa durante o processo de congelação e descongelação. A desidratação excessiva da célula durante a congelação ou o aumento excessivo de volume na descongelação danifica as membranas espermáticas e isso depende tanto da curva de refrigeração, congelação e descongelação utilizada quanto da permeabilidade da membrana ao crioprotetor (MAZUR, 1984; HAMMERSTEDT et al., 1990; HOLT, 2000).

Após a criopreservação, a integridade de membrana plasmática e acrossomal foi maior nos espermatozóides congelados nos diluidores TRIS contendo o detergente OEP (TRIS 0,5 e TRIS 1) que no TRIS (sem OEP) ou no GGL (0,4% de OEP). Foi também superior aos achados de Medina (1995) no espermatozóide ovino criopreservado em diluidor Tris e de Rodelo (2006) para sêmen ovino criopreservado em GGL, demonstrando que a adição de OEP ao diluidor Tris proporcionou um aumento na integridade da membrana plasmática. Esse diferencial nos meios Tris-gema aditivado de detergente pode ser atribuído a um efeito direto do detergente sobre as membranas espermáticas, bem como à maior solubilização dos componentes ativos da

gema pelo detergente, uma vez que todos os tratamentos foram submetidos à mesma curva de refrigeração, congelação e descongelação. El-Alamy & Foote (2001) relataram que o surfactante lauril sulfato de sódio adicionado ao diluidor Tris-glicose-gema (semelhante ao utilizado no presente estudo) pode atuar diretamente nas membranas espermáticas, produzindo mudanças na sua permeabilidade, ou sobre a gema de ovo, alterando a estrutura dos fosfolipídios. Sendo assim, isso pode ter reduzido o efeito deletério do estresse osmótico, responsável pela crioinjúria, durante a congelação e a descongelação. No entanto, era de se esperar que o mesmo ocorresse com os espermatozóides criopreservados no diluidor GGL, que também contém OEP e 20% de gema de ovo como os diluidores TRIS 0,5 e TRIS 1. Essa diferença entre os diluidores contendo detergente, pode ser conseqüência da menor concentração de OEP usada no diluidor GGL. Estudos realizados com bovinos demonstraram que a concentração ideal de detergente a ser adicionada ao diluidor depende da concentração de gema de ovo utilizada (ARIOLA & FOOTE, 1987). Esses autores observaram também que no diluidor com 20% de gema de ovo, a concentração ideal de detergente a ser usada é de 0,5 a 1%. Provavelmente, a concentração mais baixa (0,4%) de detergente utilizada no GGL não tenha sido suficiente para produzir as alterações desejáveis nos fosfolipídios da gema presente no diluidor e/ou nas membranas espermáticas. O efeito benéfico da adição de detergente ao diluidor para criopreservação de sêmen ovino, sobre a integridade de membrana plasmática e acrossomal também foi observado por Akourki et al., (2004) utilizando 0,7% de Equex-STM e por Oliveira et al., (1988) que usaram 0,5% de OEP.

A integridade acrossomal não diferiu entre os meios diluentes utilizados. Provavelmente, o efeito benéfico da adição de detergente à integridade acrossomal, observada em outros estudos com ovinos (OLIVEIRA et al., 1988, AKOURKI et al., 2004), caprinos (ABOAGLA & TERADA, 2004a) e bovinos (AHMAD & FOOTE, 1986; ARRIOLA & FOOTE, 1987), tenha sido sobreposto pelo processo de resfriamento e congelação do sêmen adotado nesse estudo. Segundo Watson (1981) o espermatozóide ovino, é muito afetado pelo choque térmico, em particular o acrossomo. Sendo que o choque térmico se inicia logo que o sêmen atinge a temperatura ambiente, embora seja mais crítica para o sêmen de carneiro a temperatura abaixo de 15°C (MAXWELL & WATSON,

1996; WATSON, 2000). No protocolo utilizado, a glicerolização aconteceu antes de se iniciar o resfriamento. Assim, quando o espermatozóide atravessou essa faixa crítica de temperatura, já se encontrava na presença do crioprotetor, o que pode ter diminuído o efeito danoso do choque térmico á membrana acrossomal. Além disso, vários estudos têm demonstrado que o processo de congelação, também causa danos à membrana acrossomal do espermatozóide ovino (AISEN et al., 2000; BYRNE et al. 2000; BAG et al., 2002a). Segundo Salamon & Maxwell (1995), os principais danos às membranas do espermatozóide do carneiro, ocorrem na faixa de temperatura entre –10°C e –25°C, quando ocorre a formação dos cristais de gelo extracelular. O'Neill 1988 *apud* Byrne et al., (2000) observou que a curva de congelação a uma taxa de –25°C/min causa menos dano acrossomal do que a –10°C. Possivelmente, nossa curva de congelação tenha proporcionado condições ótimas para a congelação do sêmen, uma vez que a redução de temperatura na faixa crítica ocorreu a uma taxa de –15°C/min, o que pode estar bem próximo do ótimo para a espécie ovina.

Após a congelação e descongelação do sêmen, o espermatozóide ovino exibe os padrões de coloração produzidos pela clortetraciclina (CTC) típicos do espermatozóide capacitado. De acordo com os padrões da CTC, ocorre uma diminuição na porcentagem de espermatozóides não capacitados (F) e aumento na porcentagem de espermatozóides capacitados (B e AR) com o acrossomo reagido ou não (Pérez et al., 1996; Gillan et al., 1997; Maxwell et al., 1999; Gil et al., 2003). Assim, para avaliar se o processo de congelação e descongelação induziu mudanças semelhantes à capacitação, no espermatozóide ovino no presente estudo, foi realizado o teste de capacitação pelo método da clortetraciclina (CTC). Usando esse método, Marti et al. (2006) observaram que no sêmen fresco de ovinos apenas metade dos espermatozóides (55,5%) não estava capacitada, enquanto 26% estavam capacitados e 18,5% com acrossomo reagido. Tomando esses dados como base, pode-se dizer que a criopreservação induziu a capacitação prematura nos espermatozóides criopreservados em todos os diluidores avaliados.

No presente estudo, o percentual de espermatozóides não capacitados (F) no sêmen criopreservado em todos os diluidores foi superior ao observado

por Gillan et al., (1997) e o de espermatozóides capacitados com acrossomo intacto (B) ou reagido (AR) foram menores do que o relatado por eles.

No entanto, ao se comparar os estádios de capacitação entre os tratamentos, observou-se que a porcentagem de espermatozóides capacitados (Padrão B) foi maior no sêmen congelado no diluidor GGL que nos outros diluidores avaliados. Vários fatores podem ter causado essa diferença entre o GGL e os outros diluidores, inclusive a composição do diluidor. A gema de ovo é tida como fator capacitante para o espermatozóide bovino (IJAZ & HUNTER, 1989). No sêmen ovino criopreservado, Gil et al., (2003) observaram que o percentual de espermatozóides capacitados (Padrão B) aumentou com o aumento na concentração de gema no diluidor (44, 51, 53 e 52% de capacitados para 5, 10, 15 e 20% de gema). O efeito capacitante da gema de ovo não explica totalmente esse alto percentual de espermatozóides capacitados no GGL, uma vez que, as concentrações de gema nos três diluidores a base de TRIS foram iguais ou ligeiramente inferiores á do GGL, possivelmente houve a interação de vários fatores na determinação desse resultado.

Sabe-se que a criopreservação induz alterações nas membranas do espermatozóide ovino semelhante às observadas na capacitação. No entanto segundo Green & Watson (2001) e Thomas et al. (2006) as rotas ativadas durante ambos os processos são diferentes, mesmo que o produto final pareça o mesmo, com o espermatozóide chegando ao final da criopreservação com a um grau de desorganização das membranas que daria a impressão de que passou pelo processo de capacitação. Sendo assim, pode-se supor que a composição do diluidor GGL, pode ter tido sua contribuição na redução da viabilidade espermática pós-descongelação em comparação com os diluidores à base de Tris. A associação de vários crioprotetores não penetrantes (glicina, proteínas do leite e gema) ao glicerol, no GGL pode ter produzido um gradiente osmótico maior, causando uma maior desidratação da célula durante a criopreservação e acarretando maiores danos à membrana plasmática (fato observado nesse estudo) e, conseqüentemente, uma diminuição nos parâmetros da motilidade e aumento nos padrões de coloração pela CTC, semelhantes à capacitação.

A inclusão do detergente lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluente Tris-gema melhorou a motilidade, a motilidade progressiva e a integridade de membrana do espermatozóide ovino após a descongelação. O mecanismo de ação do detergente, ainda não está totalmente esclarecido. Para Ariola & Foote (1987) parte do efeito do detergente é exercido por meio do diluidor. Eles observaram uma relação positiva entre a concentração de detergente e a concentração de gema a ser adicionada ao diluidor. Em estudo subseqüente, Foote & Ariola (1987) observaram que a adição de detergente ao diluente a base de leite, sem gema, foi letal aos espermatozóides e quando a gema de ovo estava presente no meio nas concentrações de 10 ou 20% houve um efeito benéfico da adição do detergente sobre a motilidade espermática, demonstrando claramente que o detergente interage com os componentes da gema de ovo, provavelmente os fosfolipídios, que estão presentes em alta concentração.

Em todos os parâmetros avaliados da viabilidade espermática, os resultados obtidos para o diluente Tris-gema aditivado com 0,5 e 1% de OEP foram semelhantes entre si e significativamente superiores ao controle (0,4% de OEP) ou ao diluente Tris (0% de OEP). Isso indica que, provavelmente, estas sejam as concentrações ideais de OEP para o sêmen ovino o que está de acordo com os achados de Arriola & Foote, (1987) os quais recomendam as mesmas concentrações (0,5 a 1%) como ideais para o sêmen bovino. Além disso, Aboagla & Terada (2004a) especulam que quando uma alta concentração de detergente é adicionada ao diluente, ocorre um aumento nas suas moléculas livres, as quais podem se ligar diretamente à membrana espermática causando lesões.

5.4 Conclusões

A criopreservação teve um efeito deletério sobre a motilidade e integridade de membranas do espermatozóide ovino;

A criopreservação induziu, alterações na membrana semelhantes á capacitação espermática, avaliada pelo método da Clortetraciclina;

A adição do detergente lauril sulfato de sódio (OEP) nas concentrações de 0,5 ou 1%, ao diluente TRIS, contendo 20% de gema de ovo, melhorou a congelabilidade do espermatozóide ovino.

O meio Tris-gema aditivado de OEP (0,5 ou 1%), avaliado nesse estudo, poderá ser utilizado para a congelação do sêmen de carneiros.

6 - EXPERIMENTO 2

GERAÇÃO DE METABÓLITOS REATIVOS DO OXIGÊNIO E VIABILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN OVINO CRIOPRESERVADO EM DILUIDORES COM ANTIOXIDANTES

6.1 Materiais e Metódos

6.1.1 Animais Experimentais e Colheita do sêmen

Foram utilizados, 23 carneiros da raça Santa Inês, andrologicamente aptos, conforme proposto por Fonseca et al. (1992). De cada carneiro foi coletado e processado um ejaculado. A colheita foi feita por meio de vagina artificial.

6.1.2 Avaliações do Sêmen Pré-Criopreservação

Após a colheita o sêmen era mantido em banho-maria a 32°C e imediatamente avaliado quanto ao aspecto, volume, concentração e motilidade subjetiva. Eram também retiradas amostras para posterior avaliação da morfologia espermática. Foram processados apenas os ejaculados com motilidade ≥ 70%.

Avaliação da concentração espermática

Para avaliação da concentração espermática, o sêmen foi diluído na proporção de 1:400. Para isso, uma alíquota de 10μL de sêmen era diluída em 4mL de água e em seguida, procedia-se à leitura em câmera de Neubauer, sob microscopia óptica comum em um aumento de 200x.

Avaliação subjetiva da motilidade espermática

A avaliação subjetiva da motilidade espermática foi realizada em microscopia de contraste de fase (aumento de 200x). Uma alíquota de sêmen contendo $12x10^6$ espermatozóides foi diluída em 250µL de X-Cell, em seguida, uma gota do sêmen diluído foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37 °C e avaliada. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Diluição e criopreservação do sêmen

Após as avaliações, o ejaculado foi dividido em quatro frações e diluído com um dos meios diluidores (tratamentos) descritos abaixo. Foram processadas, no mínimo cinco e no máximo oito palhetas de sêmen para cada tratamento.

Tratamentos:

TRIS:TRIS com 1,0% OEP (pH 6,91; Osmolaridade 308 mOsm, ANEXO 1-B);

TRO+: TRIS aditivado com Trolox[20], 50µMol/$100x10^6$ spz;

CAT+: TRIS aditivado com Catalase[21], 50µg/mL (0,0935 U/mL);

TRO/CAT+: TRIS aditivado com Trolox e Catalase, nas concentrações acima.

A diluição foi feita a 32°C em duas etapas, de forma a se obter a concentração de $400x10^6$ espermatozóides/mL. Na primeira diluição, acrescentou-se a fração não glicerolizada do diluente e, em seguida, a fração glicerolizada. Inicialmente o sêmen era diluído no meio TRIS com 1% OEP e somente após a segunda diluição era acrescentada a quantidade necessária dos aditivos (Trolox e/ou Catalase) para se obter a concentração desejada em cada tratamento. Para isso, preparou-se uma solução Estoque de Trolox a 10mM: (0,0125g de Trolox em 5mL de Tampão Tris) e uma Solução Estoque de catalase a 12,5mg/mL (0,0125g de catalase em 1,0mL de Tampão Tris).

[20] 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2 carboxilic acid, ALDRICH (CAT: 23,881-3)
[21] Catalase from bovine liver, SIGMA (C-9322) c/ 1,87U/mg

Essas soluções foram armazenadas em mini tubos[22] e mantidas a –20°C. No momento do processamento do sêmen as mesmas eram descongeladas e mantidas a 37°C até a adição ao sêmen diluído. O volume do aditivo a ser acrescentado era calculado de acordo com o número de palhetas processadas em cada tratamento e era subtraído do volume calculado para o meio I.

Após a diluição e suave homogeneização, o sêmen era envasado em palhetas de 0,25mL lacradas com álcool polivinílico e em seguida submetido à refrigeração e congelação em sistema automatizado (Tetakon® -TK 3000, TK Tecnologia em congelação Ltda).

Na curva de refrigeração e congelação utilizada (P3.S1), a refrigeração do sêmen de 32°C a 5°C ocorreu a uma taxa de 0,25°C/min, atingindo os 5°C após cerca de 90 minutos de refrigeração, sendo mantido nessa temperatura até completar 120 minutos. Em seguida, o cilindro era colocado na caixa contendo nitrogênio líquido, no volume indicado pelo fabricante e iniciava-se a curva de congelação, a qual ocorreu a uma taxa de queda de temperatura de -20° C/min até atingir –120°C.

Após atingir os -120°C, as palhetas eram retiradas da máquina e colocadas diretamente no nitrogênio líquido (–196°C), distribuídas em raques e armazenadas em botijão criobiológico, até a avaliação.

6.1.3 Avaliações do Sêmen Pós-descongelação

Para avaliação do sêmen criopreservado, duas palhetas de sêmen de cada carneiro e tratamento foram descongeladas, em banho-maria a 40°C por 20 segundos. Após a descongelação, o sêmen foi depositado em um microtubo e mantido a 37°C até a realização das avaliações.

Avaliação computadorizada da motilidade espermática

Uma alíquota de 33µL de sêmen ($13,2x10^6$ spz) descongelado era diluída em 250µL de X-CELL e mantido a 37°C por 5 minutos e em seguida

[22] Microtubes MCT-060-C - 0,6mL clear, Axygen Scientific INC

submetido a avaliação computadorizada da motilidade (Hamilton Thorn Biosciences version IVOS 12, Sperm Analysis System), em câmara de MAKLER aquecida a 37°C, usando para ajuste do aparelho os valores: *frames per sec*:60Hz, *number of frame*: 30, *minimum contrast*: 60, *minimum cell size*: 5 pix, *progressive cells* VAP = 75 μm/s, VAP *cutoff*: 21.9μm/s, *progressive cells* STR: 80%; VSL *cutoff:* 6.0μm/s. Em cada amostra foram avaliados três campos escolhidos aleatoriamente e medidos os seguintes parâmetros da motilidade: motilidade total (MT, %); motilidade progressiva (MP, %); velocidade de trajeto (VAP, μm/s); velocidade curvilinear (VCL, μm/s), velocidade progressiva (VSL, μm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), freqüência de batimentos do flagelo (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %), espermatozóides com movimento rápido (RAP, %) e espermatozóides estáticos (STATIC, %).

Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

A integridade das membranas plasmática e acrossomal e a função mitocondrial foram avaliadas pela associação das sondas fluorescentes: iodeto de propídio (IP), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA[23]) e iodeto de 5,5',6,6' tetracloro-1,1,3,3' - tetraetil benzimidazolil carbocianina (JC-1[24]). Para isso, 60μL de sêmen foram diluídos em 450μL de X-CELL ao qual foram adicionados 1,5μL de IP (0,5mg/mL em solução salina), 1,5μL de JC-1 (153μM em DMSO[25]) e 25μL da solução de FITC-PSA (100μg/mL em PBS). A amostra foi incubada por 5 a 8 minutos a 37°C e em seguida uma gota foi colocada entre lâmina e lamínula e 100 espermatozóides foram avaliados sob microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência Leica DM LB), usando o filtro I3 (excitação BP 450-490nm e supressão LP 515nm), com aumento de 1000x e classificados quanto ao padrão de coloração (Tabela 7).

[23] FITC-PSA (SIGMA, L-0770)
[24] JC-1 (Molecular Probes, T-3168)
[25] DMSO (SIGMA- D2650)

TABELA 7: Classificação das células em categorias de acordo com a integridade da membrana plasmática e acrossomal e a função mitocondrial, detectada pelas sondas fluorescentes: iodeto de propídio (IP), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e iodeto de 5,5',6,6' tetracloro- 1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1)

CATEGORIA	DESCRIÇÃO
F1	Membrana Plasmática Intacta (IP-), Acrossomo Intacto (FITC/ PSA -) e com alto potencial de membrana mitocondrial (JC-1 vermelho/alaranjado).
F2	Membrana Plasmática Intacta (IP-), Acrossomo Intacto (FITC/ PSA -) e com Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial (JC-1 verde).
F3	Membrana Plasmática Intacta (IP-), Acrossomo Lesado (FITC/ PSA +) e com Alto Potencial de Membrana Mitocondrial (JC-1 vermelho/alaranjado).
F4	Membrana Plasmática Intacta (IP-), Acrossomo Lesado (FITC/ PSA +) e com Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial (JC-1 verde).
F5	Membrana Plasmática Lesada (IP+), Acrossomo Intacto (FITC/ PSA -) e com Alto Potencial de Membrana Mitocondrial (JC-1 vermelho/alaranjado).
F6	Membrana Plasmática Lesada (IP+), Acrossomo Intacto (FITC/ PSA -) e com Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial (JC-1 verde).
F7	Membrana Plasmática Lesada (IP+), Acrossomo Lesado (FITC/ PSA +) e com Alto Potencial de Membrana Mitocondrial (JC-1 vermelho/alaranjado).
F8	Membrana Plasmática Lesada (IP+), Acrossomo Lesado (FITC/ PSA +) e com Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial (JC-1 verde).

Nas células IP positivas (+), o núcleo apresenta fluorescência em vermelho; nas FITC/PSA positivo (+), a região acrossomal apresenta fluorescência verde amarelado; nas células com alto potencial de membrana mitocondrial, o JC-1 cora a região da peça intermediária em vermelho ou

alaranjado e naquelas com baixo potencial de membrana mitocondrial essa região está corada em verde. De acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, as células foram classificadas nas oito categorias relacionadas na Tabela 7.

Quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática

A peroxidação dos lipídios da membrana plasmática dos espermatozóides foi determinada pelo método espectrofotométrico dos TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), descrito por Buege & Aust (1978), o qual baseia-se na quantificação do complexo formado pela reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malonaldeído (MDA), formando um cromógeno de coloração rósea, o qual é quantificado num comprimento de onda de 532 nm (Anexo 3).

Para a determinação dos níveis de lipoperoxidação no sêmen criopreservado, foram descongeladas duas palhetas de sêmen (com 10^8 espermatozóides) de cada carneiro e cada tratamento. A dosagem da concentração de TBARS na amostra de sêmen foi determinada da seguinte maneira: em um tubo falcon depositou-se 0,5 mL da amostra (sêmen: uma palheta com volume aproximado de 200µL + Tampão Tris-ácido cítrico, pH 7,4 recém-preparado, até completar o volume para 0,5mL). Em seguida, adicionou-se 1mL do reagente TBA (15% de ácido tricloroacético[26]; 0,25N de ácido clorídrico[27] e 0,375% de ácido tiobarbitúrico[28]) e 1% (v/v) de BHT[29] 50mM usado para evitar a autoxidação dos lipídios, catalisada por íons de metais, durante o aquecimento (LAPENNA et al., 2001) com o reagente tiobarbitúrico. Os tubos contendo esta mistura foram incubados em banho fervente por 15 minutos e em seguida, resfriados em um recipiente com gelo triturado. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 1200xg por 15 minutos e o sobrenadante, mantido em banho de gelo, foi utilizado para a análise espectrofotométrica. O ensaio foi realizado em duplicata e a absorbância da

[26] Trichloroacetic acid AR – Mallinc Krodt Baker – 2928-08
[27] Hydrochloric acid – JT Baker, 9535-02
[28] 2-Thiobarbituric acid – FLUKA, 88481

amostra foi determinada a 532nm contra um branco composto por 1mL de reagente TBA e 0,5mL de tampão Tris. Todas as análises foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer - Lambda 25) a 25°C.

À segunda amostra (500µL de sêmen + tampão Tris) foi adicionado 0,24mM de sulfato ferroso heptahidratado[30] (2,4mM) para induzir a lipoperoxidação e as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, adicionou-se a cada amostra 1mL do reagente TBA e 15µL de BHT e procedeu-se o protocolo igual ao da mensuração de TBARS na amostra. Este segundo procedimento é conhecido como lipoperoxidação induzida ou catalisada por ferro e tem por objetivo medir todo o potencial que a amostra teria de gerar o radical em questão, sendo, portanto, considerado o controle positivo da reação.

A dosagem da concentração de TBARS nas amostras dos quatro diluidores foi determinada diretamente no diluente livre de espermatozóide. As amostras dos diluidores foram descongeladas e uma alíquota de 100µL foi utilizada para a determinação da lipoperoxidação dos lipídios da gema de ovo presente no diluidor, seguindo o mesmo protocolo utilizado para a amostra de sêmen.

Para o cálculo das concentrações de TBARS geradas nas amostras, os resultados obtidos em ambas as amostras (sêmen ou diluidor) foram comparados com uma curva de calibração feita diariamente com malonaldeído (MDA) como padrão, nas concentrações de 1 a 20µmol. Foi preparada uma solução estoque de MDA 10mM pela hidrólise de 17µL de malonaldehyde bis (dimetil acetal)[31] em 10mL de HCl 2N por 10 minutos a temperatura ambiente. Para cada 1mL de reagente TBA era adicionada a quantidade necessária da solução estoque de MDA para resultar em uma concentração final de MDA de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 e 30nMol/mL. A curva e o Branco foram tratados da mesma maneira que a amostra.

Os resultados são dados em nmol de TBARS/10^8 espermatozóides ou nmol de TBARS/mL de diluidor.

---

[29] Butylated hydroxytoluene (ALDRICH, A-06107TC)
[30] Iron (II) Sufate heptahydrate (FeO_4S-$7H_2O$) – FLUKA , 44970
[31] 1,1,3,3-tetrametoxopropano (Malonaldehyde bis (dimetil acetal) – ALDRICH – 10,838-3

Mensuração do ânion superóxido (O_2^-)

A mensuração da produção de O_2^- no sêmen e no diluidor foi realizada em espectrofotômetro pelo método da redução do NBT[32] (nitro blue tetrazolium) a qual baseia-se na habilidade do O_2^- para reduzir o NBT (corante amarelo) a um produto azul chamado diformazan (Anexo 4). O sistema hipoxantina-xantina oxidase foi empregado como gerador contínuo de O_2^-. A velocidade de redução do NBT foi medida no comprimento de onda de 560nm de absorbância, conforme metodologia descrita por Aruoma et al. (1989).

Para a mensuração da geração de O_2^- na amostra, procedeu-se da seguinte maneira: em uma cubeta de 1cm de caminho óptico com capacidade para um volume final de mistura reacional de 700µL, adicionou-se: 460µL de solução tampão Tris-ácido cítrico (pH 7,4), 70µL de EDTA[33] (10mM) e 100µL da amostra de sêmen ou diluidor. Em seguida, a mistura era homogeneizada suavemente e levada ao espectrofotômetro programado para uma reação cinética em 3 minutos. A reação foi iniciada com a injeção de 70µL de NBT (1mM) na cubeta. Após o termino da reação, calculou-se a taxa de mudança na absorbância por minuto (ΔA_{560}/min), durante os três minutos de reação.

Em uma segunda alíquota (sistema gerador de O_2^- - HXO), injetou-se na cubeta os seguintes reagentes: 383µL de tampão Tris ácido cítrico (pH 7,4), 70µL de EDTA (10mM), 70µL de NBT (1mM), 7µL de hipoxantina[34] (10mM) e 100µL da amostra (sêmen ou diluidor). Homogeneizou-se a mistura e levou-se ao espectrofotômetro programado para uma reação cinética em 3 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 0,0666U de xantina oxidase[35] recém-diluída em 70µL de tampão Tris (pH 7,4). A taxa de redução do NBT foi medida a 560nm em espectrofotômetro UV-VIS, duplo feixe (Lambda 25 – Perkin Elmer), cujo compartimento da cubeta era termostatizado a 25°C.

Cálculo da concentração de O_2^- na amostra:

O valor correspondente da taxa de variação da absorbância ao tempo de 1 minuto (ΔA_{560}/min) foi convertido em nanomoles de NBT reduzido,

[32] Nitrotetrazolium Blue chloride, FLUKA- Biochemika, 74030
[33] Ethylenediminetetraacetic acid (SIGMA, E9884)
[34] Hypoxanthine – FLUKA – Chemika, 56700
[35] Xanthine oxidase, Grade I from buttermilk – SIGMA, X 1875

multiplicando-se o valor encontrado pela constante 27,56 e considerando-se que 1 mol de O_2^- reduz 1 mol de NBT. Essa constante representa o valor da densidade ótica (DO) da mistura reacional obtida a 560nm, para 0,7mL de mistura reacional, em uma cubeta com 1cm de caminho ótico, onde a densidade ótica observada representa a absorbância apenas do NBT reduzido (na forma de Formazan), adotando-se para isso um coeficiente de extinção molar para o formazan em pH básico de E = 25400 $M^{-1}cm^{-1}$, determinado por Bielski et al., (1980).

Os resultados da mensuração de O_2^- foram expressos em nMol O_2^- /40x10^6 espermatozóides.

Mensuração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio contido no sêmen e no diluidor foi medido pelo método colorimétrico do phenol red (Anexo 5). O ensaio baseia-se na oxidação do phenol red pelo H_2O_2, mediada pela *horseradish* peroxidase (HRPO), a qual resulta na formação de um composto com alta absorbância a 610nm. Na presença de HRPO exógena, o phenol red muda de cor, do vermelho para o amarelo, sempre que grande quantidade de H_2O_2 é produzida no meio. Elevando o pH para 12,5 a cor amarela torna-se púrpura e permanece inalterada por um longo período de tempo e sua absorbância pode ser lida a 610nm (PICK & KEISARI, 1980).

Para a dosagem da quantidade de H_2O_2 liberada pelos espermatozóides, tomou-se uma amostra de 100 µL de sêmen (40x10^6 espermatozóides) a qual foi colocada em minitubo e mantida a 37°C. Ao sêmen foi adicionado 1,0mL do reagente *phenol red* (140mMol NaCl, 10 mmol de fosfato de potássio pH 7,0 ; 5,5mmol de glicose; 0,28mmol de phenol red[36] e 8,5 U/mL de horseradish peroxidase[37]). O *phenol red* e a peroxidase foram acrescentados imediatamente antes da realização do ensaio. Assim, primeiramente era adicionada à amostra 975µL da solução Tampão *phenol red* (todos os reagentes, menos o phenol red e a peroxidase), 10µL da solução de

[36] Phenol Red – SIGMA, P3532

phenol red 10mg/mL e 15µL da solução de horseradish peroxidase 5mg/mL (8,5U/mL). A amostra foi incubada a 37°C por 30 minutos e em seguida, centrifugada a 4000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e a reação foi finalizada pela adição de 10µL de hidróxido de sódio (NaOH) a 1N. O ensaio foi realizado em duplicata e as leituras foram feitas a 610nm contra um Branco composto por 1mL do reagente *phenol red* (completo) e 10µL de NaOH. As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS, com duplo feixe (Lambda 25 – Perkin Elmer), cujo compartimento da cubeta foi mantida a 25°C. Utilizou-se cubetas de 1cm de caminho ótico com capacidade para 0,7mL.

A uma segunda alíquota de sêmen, além dos reagentes do ensaio, adicionou-se 100 µmol de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 exógeno) e procedeu-se o processamento e análises da mesma forma que a amostra. Esse procedimento foi denominado sistema gerador e tem o mesmo objetivo do sistema gerador da lipo peroxidação.

O ensaio foi padronizado com concentrações conhecidas de H_2O_2, obtidas de uma solução cuja concentração era conhecida. Para isso, elaborou-se uma curva padrão com concentrações de 1 a 60 µmol de H_2O_2 (1 a 60 nmol/mL). Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de H_2O_2, diluindo-se 102µL de peróxido de hidrogênio 30%[38] em 100mL de água destilada (ultrapura), o que teoricamente resultaria em uma concentração de 10 mmol, no entanto, a concentração real da solução foi determinada medindo-se a absorbância da mesma a 230nm e usando o coeficiente de absorção molar $E = 81M^{-1}cm^{-1}$, o que nos deu uma concentração de 7,8 mmol. A solução foi armazenada em geladeira, em frasco de vidro âmbar, envolto com papel alumínio, até a utilização. Para cada 1mL de reagente fenol red, foram acrescentados volumes diversos da solução estoque de H_2O_2, de modo a obter as concentrações finais de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µmol de H_2O_2. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 10µL de NaOH a 1N e mediu-se a absorbância a 610nm.

Os resultados da mensuração de H_2O_2 foram expressos em nmol de $H_2O_2/40x10^6$ espermatozóides/30 min.

---

[37] Peroxidase from horse radish (113U/mg)- FLUKA, Biochemika 77330
[38] Perhydrol 30% H_2O_2 PA- Merck, 7209.1000

6.1.4 Análise estatística

Os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com 23 blocos (carneiros) e quatro tratamentos (diluentes). Foram avaliadas duas palhetas de cada ejaculado/tratamento, perfazendo um total de 184. O efeito dos tratamentos sobre os parâmetros da motilidade espermática, integridade de membranas e integridade acrossomal foi avaliado através da análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Duncan a $P<0,05$. O esquema da análise de variância é apresentado na Tabela 8.

TABELA 8: Esquema da Análise de Variância – Experimento 2

FONTE DE VARIAÇÃO	GL
TOTAL	183
TRATAMENTO	3
BLOCO	22
RESÍDUO	158

6.2 Resultados

Observou-se efeito do carneiro em todos os parâmetros espermáticos avaliados (Anexos 5), o que demonstra a heterogeneidade do grupo de animais utilizados. Os tratamentos influenciaram significativamente (P<0,05) quase todos os parâmetros da motilidade espermática (exceto VSL e BCF) e o percentual de espermatozóides nas categorias F1, F2, F6 e F8 da avaliação conjunta da integridade de membrana plasmática, membrana acrossomal e função mitocondrial (Anexo 6.1 e 6.2).

6.2.1 Avaliação computadorizada da motilidade espermática

A motilidade espermática do sêmen criopreservado, avaliada pelo sistema computadorizado, foi influenciada pelo meio diluidor. A motilidade total (MT) foi significativamente maior (P<0,05) no sêmen congelado no meio TRIS (controle; 71,8 ± 1,5%) que nas amostras congeladas com Trolox (TRO+; 64,7± 1,5%) ou com a associação de Trolox e catalase (TRO/CAT+; 61,1 ± 1,5%). Enquanto que o sêmen congelado no meio Tris com catalase (CAT+; 69,3 ± 1,5%) apresentou resultados de MT semelhantes aos do controle (Tabela 9).

A motilidade progressiva (MP) foi significativamente maior (P<0,05) nos espermatozóides congelados no diluidor CAT+ (30,5± 1,1%) que naqueles congelados nos diluidores TRO+ ou TRO/CAT+ (25,5 ± 1,1 e 27,0 ± 1,1%, respectivamente). Já o sêmen congelado no diluidor TRIS apresentou resultados semelhantes aos dois últimos (Tabela 9).

Das velocidades espermáticas avaliadas pelo método CASA, apenas a velocidade progressiva (VSL) não foi influenciada pelo diluidor (P>0,05). A velocidade de trajeto (VAP) foi significativamente maior (P<0,05) nos espermatozóides congelados com os diluidores TRIS e CAT+ (95,4 ± 1,1 e 96,0 ± 1,2%, respectivamente) que naqueles congelados no TRO/CAT+ (91,7 ±1,2%), enquanto que nas amostras congeladas no TRO+ a VAP foi semelhante (92,6 ± 1,2) à observada nos outros três grupos. A velocidade curvilinear (VCL) também foi influenciada significativamente pelo meio diluidor (P<0,0003). O sêmen congelado nos diluidores TRIS e CAT+ apresentou

valores maiores (169,7 ± 1,6 e 168,5 ± 1,6%) que os observados no TRO+ e TRO/CAT+ (163,7± 1,6 e 160,7 ± 1,6%) e semelhantes entre si (Tabela 9).

A amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide (ALH) foi maior (P<0,0420) nos espermatozóides criopreservados no meio TRIS (7,7 ± 0,1μm) que naqueles congelados no TRO+ e CAT+ (7,4 e 7,5 ± 0,1μm). Nos espermatozóides criopreservados com TRO/CAT+, o ALH foi 7,6 ± 0,1μm, valor esse semelhante aos demais grupos (Tabela 9).

TABELA 9: Médias ± erro padrão dos parâmetros da cinética espermática: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), freqüência de batimentos do flagelo (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), espermatozóides rápidos (RAP) e estáticos (STATIC) obtidos pelo sistema de análises computadorizada da motilidade espermática (CASA) no sêmen ovino congelado nos diluidores TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT+ .

PARÂMETRO	**DILUIDOR**			
	TRIS	TRO+	CAT+	TRO/CAT+
MT (%)	71,8 ± 1,5[a]	64,7 ± 1,5[b]	69,3 ± 1,5[a]	61,1 ± 1,5[b]
MP (%)	28,8 ± 1,1[ab]	25,5 ± 1,1[c]	30,5 ± 1,1[a]	27,0 ± 1,1[bc]
VAP (μm/s)	95,4 ± 1,2[a]	92,6 ± 1,2[ab]	96,0 ± 1,2[a]	91,7 ± 1,2[b]
VCL (μm/s)	169,7 ± 1,6[a]	163,7 ± 1,6[b]	168,5 ± 1,6[a]	160,7 ± 1,6[b]
VSL (μm/s)	73,1 ± 1,1	72,3 ± 1,1	75,2 ± 1,1	72,4 ± 1,1
ALH (μm)	7,7 ± 0,1[a]	7,4 ± 0,1[b]	7,5 ± 0,1[b]	7,6 ± 0,1[ab]
BCF (Hz)	36,6 ± 0,4	37,1 ± 0,4	37,1 ± 0,4	36,4± 0,4
STR (%)	72,6± 0,4[b]	74,7 ± 0,4[a]	74,5 ± 0,4[a]	74,3 ± 0,4[a]
LIN (%)	42,7 ± 0,5[b]	44,6 ± 0,5[a]	44,5 ± 0,5[a]	44,8 ± 0,5[a]
RAP (%)	47,1 ± 1,5[a]	40,8 ± 1,5[b]	45,9 ± 1,5[a]	39,1 ± 1,5[b]
STATIC (%)	19,3 ± 1,5[b]	27,1 ± 1,5[a]	21,1 ± 1,5[b]	28,7 ± 1,5[a]

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si a P<0,05 pelo teste Duncan.
TRIS: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP; TRO+: diluidor TRIS aditivado com Trolox, CAT+: diluidor TRIS aditivado com catalase, TRO/CAT+: diluidor TRIS + Trolox e catalase.

A freqüência de batimentos do flagelo (BCF) foi semelhante entre os tratamentos (P>0,05) variando de 36,4Hz no diluidor TRO/CAT+ a 37,1Hz no TRO+ e CAT+ (Tabela 9).

Dos parâmetros que definem a progressividade dos movimentos espermáticos, a retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) apresentaram comportamento semelhante entre os grupos de tratamentos. A retilinearidade dos espermatozóides congelados no diluidor TRIS (72,6%) foi menor (P<0,05) que a dos espermatozóides preservados nos outros três diluidores. A linearidade também foi menor (P<0,05) no sêmen congelado no meio TRIS (42,7%) em relação aos demais (Tabela 9).

Os percentuais de espermatozóides com movimento rápido (RAP), foi maior (P<0,05) nos tratamentos TRIS (47,1%) e CAT+ (45,9%) que nos TRO+ (40,8%) e TRO/CAT+ (39,1%). Os espermatozóides na categoria RAP apresentaram comportamento semelhante ao da motilidade total e foram inversamente proporcionais ao percentual de espermatozóides estáticos (STATIC) em cada tratamento (Tabela 9).

6.2.2 Avaliação simultânea da *integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial*

Os percentuais de espermatozóides criopreservados, classificados de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal e com o potencial de membrana mitocondrial, detectados pela associação das sondas fluorescentes: FITC/PSA, IP e JC-1 estão apresentados na Tabela 10 e nos gráficos das Figuras 6 e 7. As categorias de fluorescência observadas na avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial do espermatozóide podem ser visualizadas na Figura 8.

O percentual de células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial (F1) foi baixo em todos os diluidores, porém houve uma diferença significativa (P<0,05) entre eles. As médias de F1 foram 1,4% no TRIS; 0,6% no TRO+; 0,7% no CAT+ e 0,5% no TRO/CAT+ (Tabela 10).

A categoria F2, na qual os espermatozóides apresentam membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial, também foi influenciada pelo tratamento. O maior (P<0,05)

percentual de células nessa categoria foi observado no CAT+ (34,1%) e o menor (27,6%) na TRO/CAT+ (Tabela 10).

TABELA 10 - Médias ± erro padrão dos parâmetros espermáticos relativos à integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, avaliados pela combinação das sondas fluorescentes: iodeto de propídio (IP), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC/PSA) e iodeto de 5,5',6,6' tetracloro- 1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) do sêmen ovino congelado nos diluidores TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT+.

PARÂMETRO	**DILUIDOR**			
	TRIS	TRO+	CAT+	TRO/CAT+
F1(%)	1,4 ± 0,2[a]	0,6 ± 0,2[b]	0,7 ± 0,2[b]	0,5 ± 0,2[b]
F2 (%)	28,4 ± 1,3[b]	31,0 ± 1,3[ab]	34,1 ± 1,3[a]	27,6 ± 1,3[b]
F5 (%)	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,1
F6 (%)	27,0 ± 0,9[b]	30,7 ± 0,9[a]	28,2 ± 0,9[ab]	28,6 ± 0,9 [ab]
F7 (%)	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1
F8 (%)	42,3 ± 1,5[a]	38,4 ± 1,5[ab]	35,9± 1,5[b]	42,2 ± 1,5[a]
MPAI (%)	29,7±1,4[b]	31,6±1,4[ab]	34,0±1,4[a]	28,0±1,4[b]
PSA + (%)	42,6± 1,5[ab]	38,7 ± 1,5[bc]	36,1 ± 1,5[c]	43,0 ± 1,5[a]
BPM (%)	97,7±0,3 [b]	98,8±0,3[a]	98,7±0,3[a]	98,3±0,3[ab]
APM (%)	2,3±0,3[a]	1,2±0,3[b]	1,3±0,3[b]	1,7±0,3[ab]

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si a P<0,05 pelo teste Duncan.
TRIS: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP; TRO+: diluidor TRIS aditivado com Trolox, CAT+: diluidor TRIS aditivado com catalase, TRO/CAT+: diluidor TRIS + Trolox e catalase.
F1: membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; F2: membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; F5: membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; F6: membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; F7: membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial; F8: membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial; MPAI: membrana plasmática e acrossomal intacta; PSA+: total de acrossomos corados pelo FITC/PSA; BPM: Baixo potencial de membrana mitocondrial; APM: alto potencial de membrana mitocondrial.

O percentual de células na categoria com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial (F5) não diferiu estatisticamente (P>0,05) entre os tratamentos. Já o percentual de espermatozóides na categoria F6 (membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com baixo potencial de membrana mitocondrial) foi diferente entre os diluidores. As medias de F6 foram: 27,0% no TRIS; 30,7% no TRO+, 28,2% no CAT+ e 28,6% no TRO/CAT+ (Tabela 10).

O percentual de espermatozóides com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com alto potencial de membrana mitocondrial (F7) não diferiu estatisticamente (P>0,05) entre os tratamentos (Tabela 10). Enquanto que a porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com baixo potencial de membrana mitocondrial (F8) foi maior (P<0,05) no sêmen criopreservado com os diluidores TRIS (42,3%) e TRO/CAT+ (42,2%) que naquele congelado no diluidor CAT+ (35,9%). O sêmen criopreservado no diluidor TRO+ (38,4%) apresentou um percentual intermediário e semelhante aos demais (Tabela 6).

Não foram observados espermatozóides nas categorias F3 e F4, nas quais, a membrana plasmática está intacta e o acrossomo lesado, com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial, respectivamente.

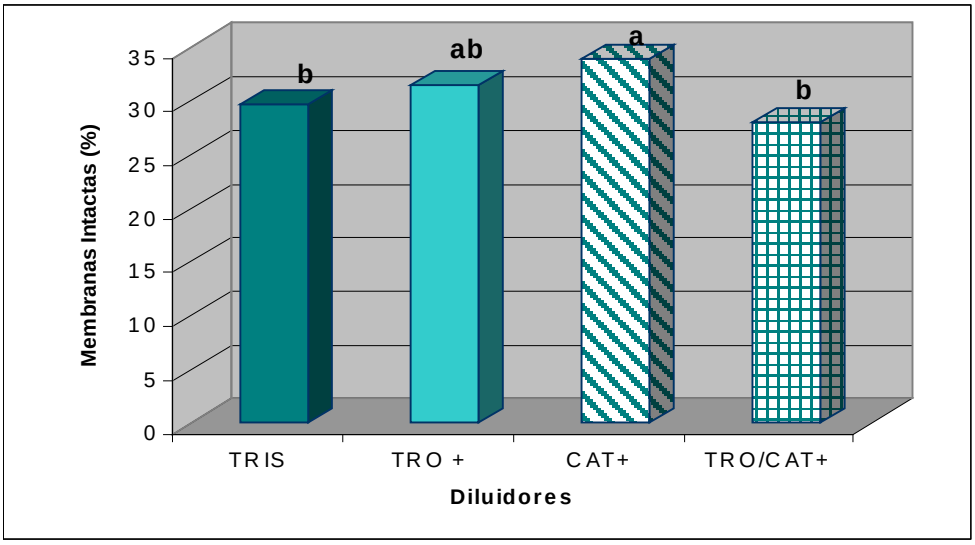


FIGURA 6 - Percentual de espermatozóides com membrana plasmática e acrossomal intactas (média ± ep, categirias F1+F2) estimada pelo método de fluorescência (IP, FITC-PSA), para o sêmen ovino criopreservado com os diluidores: TRIS, TRIS + Trolox (TRO+), TRIS + Catalase (CAT+) e TRIS + Trolox e Catalase (TRO/CAT+).

O diluidor Tris aditivado de catalase (CAT+) preservou melhor (P<0,05) a membrana plasmática e acrossomal que os demais. O percentual de células com ambas as membranas intactas (MPAI) foi de 34,0% no CAT+; 29,7% no

TRIS, 31,6% no TRO+ e 28,0% no TRO/CAT+ (Tabela 10, Figura 6). De maneira inversa, o percentual de espermatozóides com membrana acrossomal danificada (PSA+) foi significativamente menor (P<0,05) naqueles criopreservados no diluidor CAT+ (36,1%) que no TRIS (42,6%) ou no TRO/CAT+ (43,0%), enquanto que os espermatozóides criopreservados no diluidor TRO+ apresentaram um percentual de células PSA+ (38,7%) semelhante ao do CAT+ e do TRIS (Tabela 10, Figura 7).

A função mitocondrial dos espermatozóides parece ter sido afetada pela criopreservação. O percentual de espermatozóides com baixo potencial de membrana mitocondrial (BPM) foi elevado em todos os tratamentos. No entanto, foi significativamente menor (P<0,05) no TRIS (97,74%) que nos demais diluidores (Tabela 10).

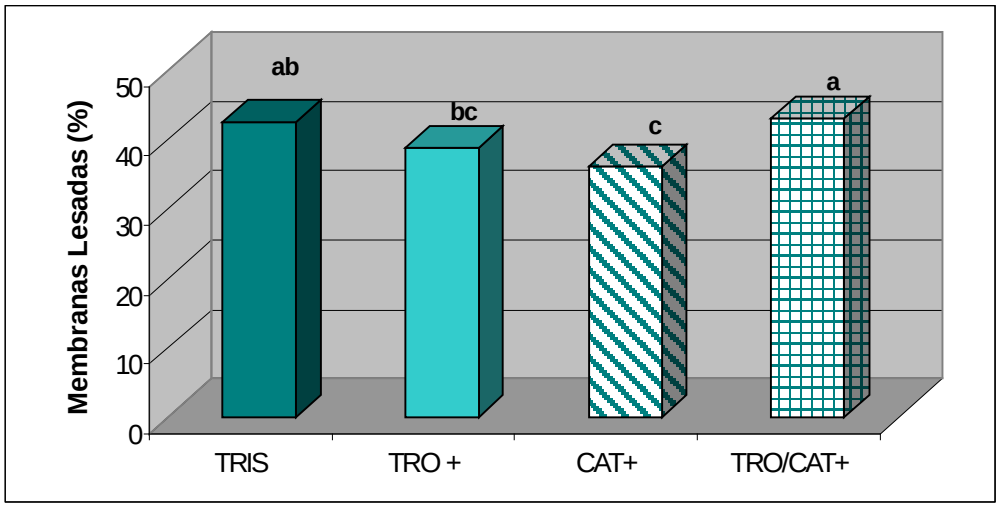
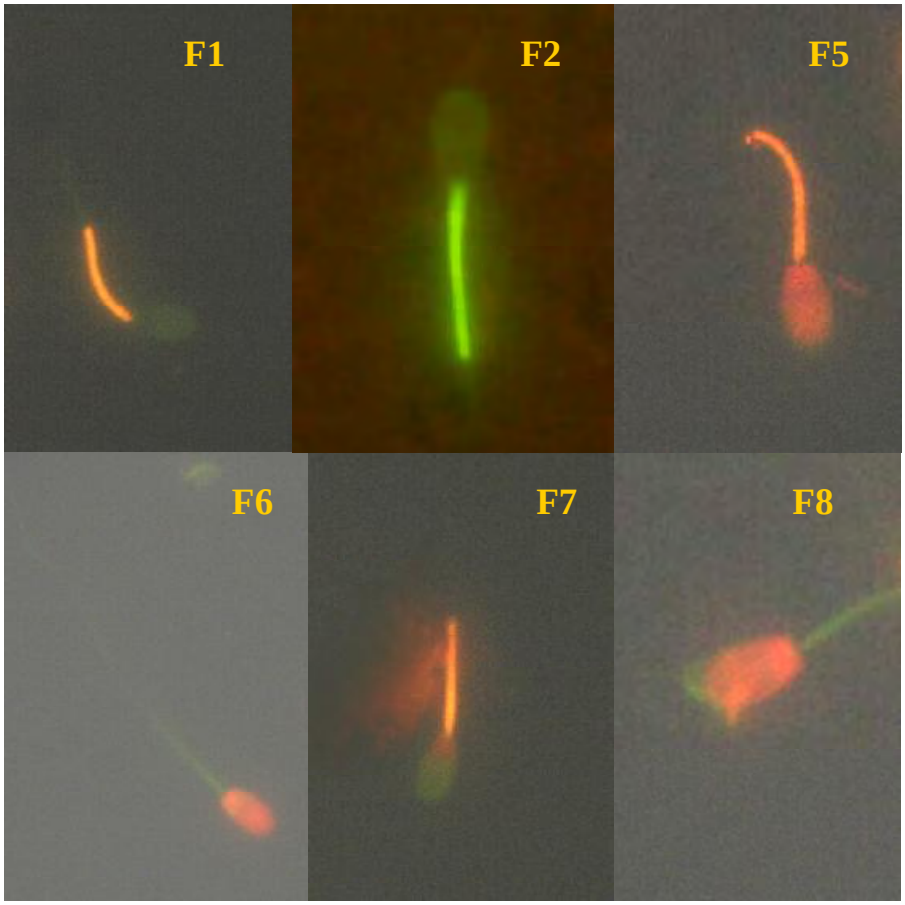


FIGURA 7 - Espermatozóides com membrana plasmática e acrossomal lesada (média ± ep, categorias F7+F8) estimada pelo método de fluorescência (FITC-PSA), para o sêmen ovino criopreservado com os diluidores: TRIS, TRIS + Trolox (TRO+), TRIS + Catalase (CAT+) e TRIS + Trolox e Catalase (TRO/CAT+).



F1: membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **F2**: membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **F5**: membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **F6**: membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **F7**: membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial; **F8**: membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial.

FIGURA 8 – Categorias de fluorescência observadas na avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial do espermatozóide, pela combinação das sondas IP, FITC-PSA e JC-1.

6.2.3 *Quantificação da lipoperoxidação*

A quantificação de TBARS nas amostras foi feita usando uma curva padrão de MDA (malonaldeído bis dimetil acetal). A curva foi linear até 20nMol/mL e a leitura foi feita na parte linear da curva (Figura 9).

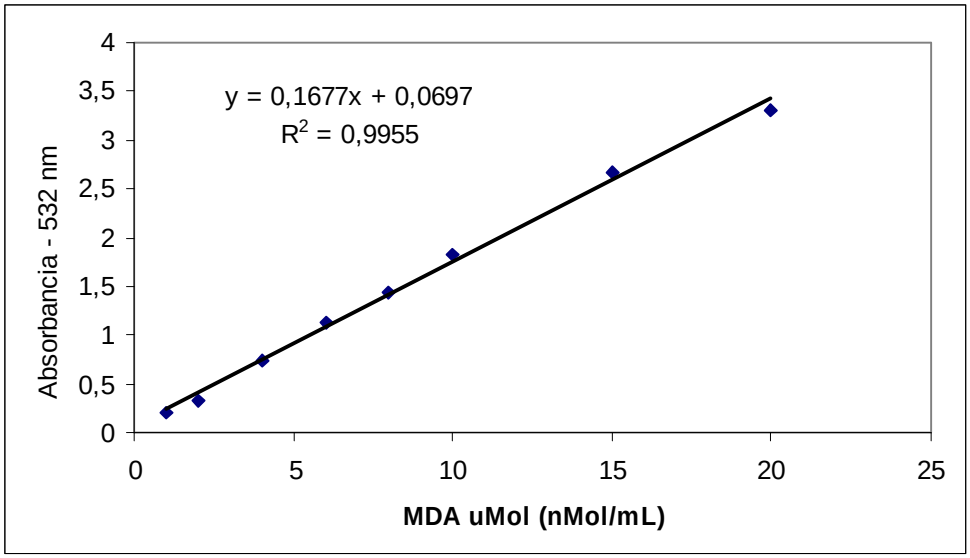


FIGURA 9 - Curva de calibração do ensaio das TBARS, usando o malonaldeído bis (dimetil acetal) – MDA nas concentrações de 1 a 20µMol.

A peroxidação dos lipídios no sêmen foi determinada imediatamente após a descongelação da amostra e não houve diferença significativa (P>0,05; Anexo 6.3) nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) geradas na lipoperoxidação espontânea, entre o sêmen criopreservado nos quatro diluidores. Os níveis de TBARS geradas foram: 1,26; 1,10; 1,29 e 1,30 ± 0,12 nmol/10^8 espermatozóides, para o sêmen criopreservado no diluidor TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT+, respectivamente (Tabela 11, Figura 10). No entanto, quando a lipoperoxidação foi catalisada pelo $FeSO_4$, após um período de incubação de 15 minutos, houve um aumento significativo (P<0,05, Anexo 6.3) na geração de TBARS em todos os tratamentos. Os mais altos níveis de TBARS foram gerados no sêmen criopreservado nos diluidores TRIS e CAT+ (3,4± 0,17 e 3,58 ± 0,17 nmol/10^8 spz), enquanto que no sêmen criopreservado

nos diluidores contendo o antioxidante Trolox (TRO+ e TRO/CAT+), a geração de TBARS foi significativamente (P<0,01) menor que nos outros dois diluidores, sendo 2,07 ± 0,17 e 2,28 ± 0,17 nmol/10^8 spz, respectivamente (Tabela 11, Figura 10).

TABELA 11 - Médias ± erro padrão das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) geradas no sêmen ovino criopreservado durante a lipoperoxidação espontânea (LE) ou catalisada por 0,24mmol de $FeSO_4$-$7H_2O$ (LC), de acordo com o tratamento. Resultados expressos em nmol de TBARS/10^8 espermatozóides.

	TBARS (nmol/10^8 spz)	
Tratamento	**Sêmen (LE)**	**Sêmen + $FeSO_4$ (LC)**
TRIS	$1,26 \pm 0,12^{B}$	$3,40 \pm 0,17^{aA}$
TRO+	$1,10 \pm 0,12^{B}$	$2,07 \pm 0,17^{bA}$
CAT+	$1,29 \pm 0,12^{B}$	$3,58 \pm 0,17^{aA}$
TRO/CAT+	$1,30 \pm 0,12^{B}$	$2,28 \pm 0,17^{bA}$
TOTAL	$1,21 \pm 0,39^{B}$	$2,83 \pm 0,01^{A}$

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha (maiúsculas) ou na mesma coluna (minúsculas), diferem entre si a P<0,05 pelo teste Duncan.
TRIS: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP; **TRO+:** diluidor TRIS aditivado com Trolox, **CAT+:** diluidor TRIS aditivado com catalase, **TRO/CAT+:** diluidor TRIS + Trolox e catalase.

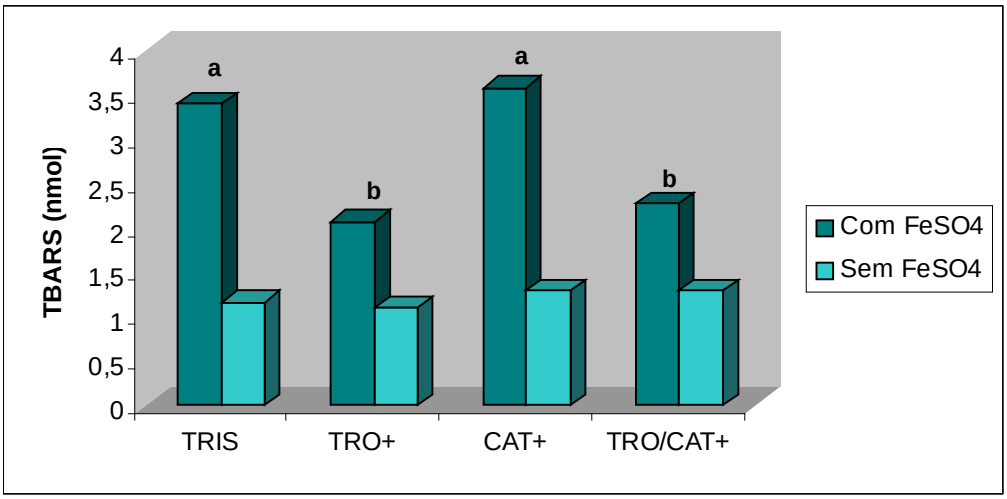


FIGURA 10 - Lipoperoxidação no sêmen ovino criopreservado nos diluidores TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT+, na presença ou não do catalisador ($FeSO_4$). P < 0,05

6.2.4 Mensuração do ânion superóxido (O_2^-)

A geração do ânion superóxido nas amostras foi realizada através do ensaio de redução do NBT (nitro blue tetrazolium) a formazan, em uma reação cinética cujo exemplo é mostrado na Figura 11.

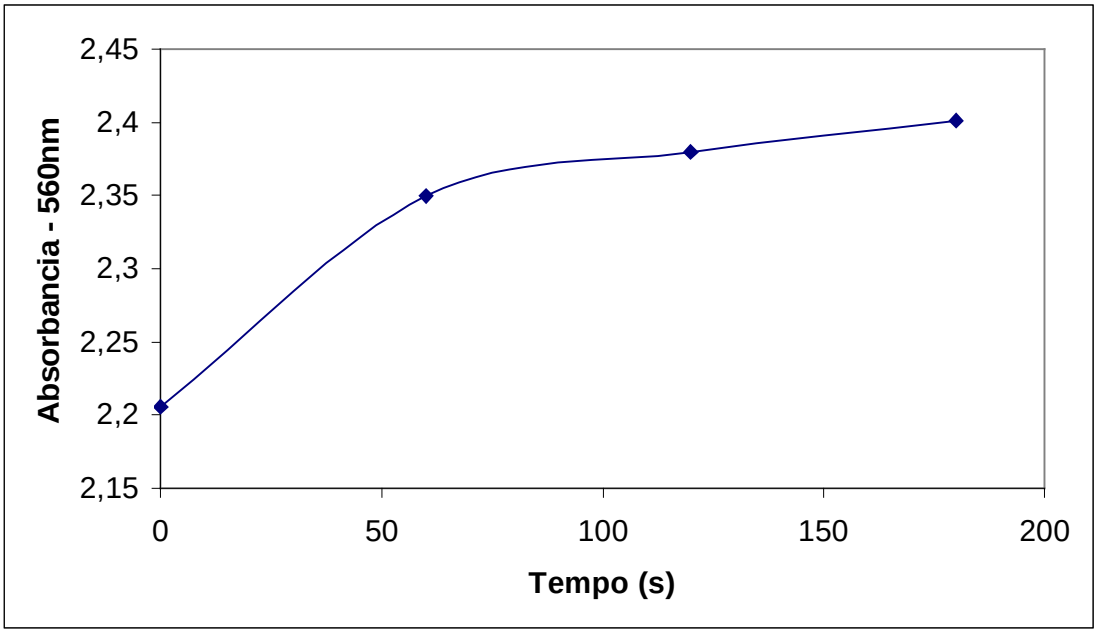


FIGURA 11 - Reação cinética da redução do NBT a formazan, pelo ânion superóxido gerado pelo sistema hipoxantina-xantina oxidase, durante 180 segundos.

Ao realizar-se a dosagem do radical O_2^- gerado no sêmen, observou-se que houve uma diferença significativa ($P<0,01$; Anexo 6.3) entre os tratamentos. No sêmen criopreservado nos diluidores TRIS e CAT+, a geração de O_2^- foi menor (0,94 e 0,99 ± 0,13 nmol/40x10^6spz, respectivamente) que nas amostras congeladas nos diluidores TRO+ (1,45±0,13 nmol/50x10^6spz) e TRO/CAT+ (1,44 ± 0,13 nmol/40x10^6spz), sugerindo que houve uma influência positiva do Trolox na geração de radicais O_2^- no sêmen (Tabela 12, Figura 12).

TABELA 12 - Médias ± erro padrão das concentrações de ânion superóxido (O_2^-) gerado no sêmen ovino descongelado e no sêmen na presença de O_2^- exógeno gerado pelo sistema hipoxantina-xantina oxidase (HXO), de acordo com o tratamento. Resultados expressos em nmol de O_2^-/40 x10^6 espermatozóides.

Tratamento	O_2^- (nmol/40x10^6spz)	
	Sêmen	**Sêmen + HXO**
TRIS	$0,94 \pm 0,13^{bB}$	$1,43 \pm 0,16^{abA}$
TRO+	$1,45 \pm 0,13^{a}$	$1,25 \pm 0,16^{b}$
CAT+	$0,99 \pm 0,13^{b}$	$1,29 \pm 0,16^{b}$
TRO/CAT+	$1,44 \pm 0,13^{a}$	$1,84 \pm 0,16^{a}$
TOTAL	$1,21 \pm 0,06^{B}$	$1,45 \pm 0,08^{A}$

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha (maiúsculas) ou na mesma coluna (minúsculas), diferem entre si a P<0,05 pelo teste Duncan.
TRIS: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP; **TRO+:** diluidor TRIS aditivado com Trolox, **CAT+:** diluidor TRIS aditivado com catalase, **TRO/CAT+:** diluidor TRIS + Trolox e catalase.

Na presença do sistema gerador de O_2^-, hipoxantina-xantina oxidase (HXO) houve um aumento na geração do radical O_2^- em todos os tratamentos, exceto no TRO+. Observou-se uma diferença significativa (P<0,01; Anexo 6.3) nos níveis gerados entre os tratamentos. A geração de O_2^- foi maior no sêmen preservado no diluidor TRO/CAT+ (1,84 ± 0,16nmol/40x10^6spz) que naquele criopreservado no TRO+ (1,25 ± 0,16 nmol/50x10^6 spz) e CAT+ (1,29 ± 0,16 nmol/40x10^6 spz) e semelhante à observada no TRIS (1,43 ± 0,16 nmol/40x10^6 spz; Tabela 12, Figura 12).

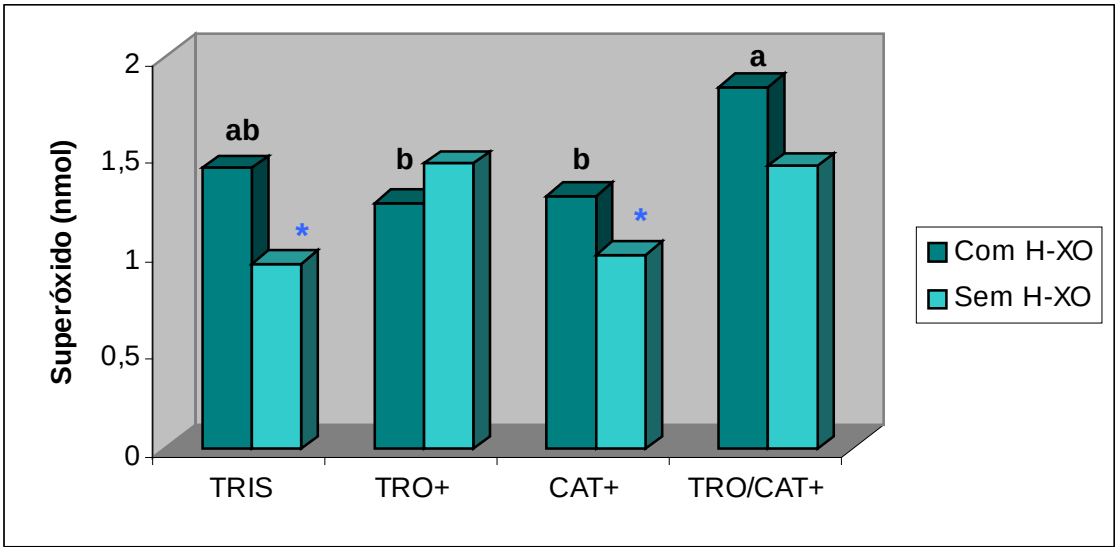


FIGURA 12 - Geração de ânion superóxido no sêmen ovino criopreservado nos diluidores TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT+, na presença ou não do sistema gerador de O_2^-, hipoxantina – xantina oxidase (HXO). $P < 0,05$ para letras diferentes sobre as colunas nas amostras incubadas com H-XO ou * no TRIS e CAT+ comparado ao TRO+ e TRO/CAT+, nas amostras incubadas sem H-XO.

6.2.5 Mensuração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A geração de peróxido de hidrogênio no sêmen foi medida pelo método do Phenol Red, o qual baseia-se na oxidação do fenol red pelo H_2O_2 na presença de peroxidase. Para determinar a concentração de H_2O_2 nas amostras, utilizou-se uma curva de calibração. A curva é linear até 60µmol e a medida das concentrações de H_2O_2 nas amostras foram feitas na porção linear da curva (Figura 13).

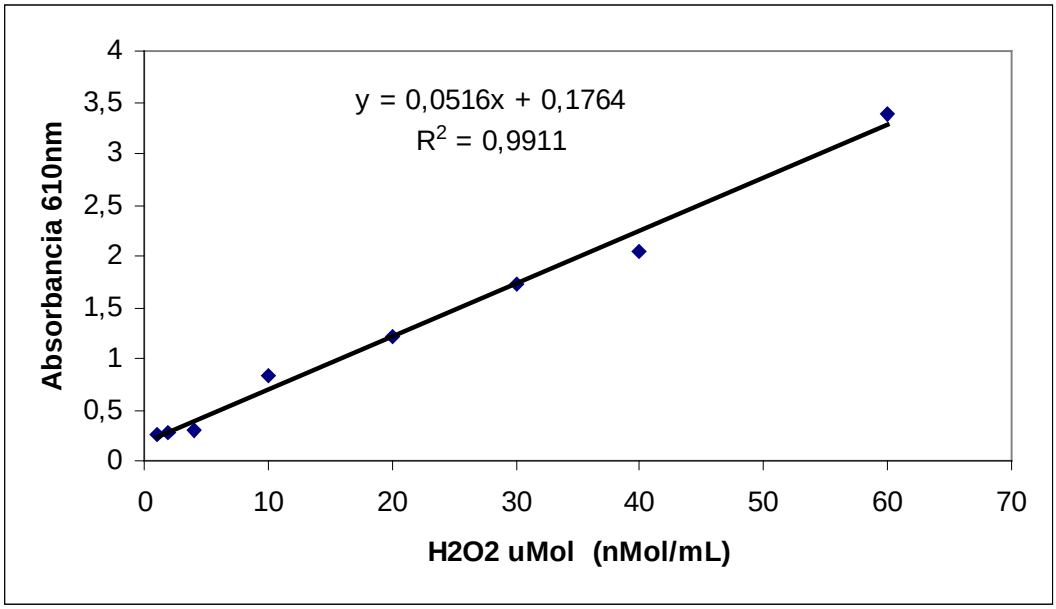


FIGURA 13 - Curva de calibração do ensaio de redução do phenol red, usando H_2O_2 nas concentrações de 1 a 60µMol.

A geração de peróxido de hidrogênio no sêmen foi significativamente (P<0,01, Anexo 6.3) diferente entre os tratamentos (Tabela 13, Figura 14). A mais alta geração de H_2O_2 foi observada no sêmen criopreservado no diluidor TRIS (6,97 ± 0,18 nmol/40 x10^6 spz/30min) e semelhante aos valores do CAT+. Não houve diferença na geração de H_2O_2 no sêmen criopreservado nos meios TRO+, CAT+ e TRO/CAT+ (6,00± 0,18; 6,53± 0,18 e 6,08± 0,18 nmol /40 x10^6 spz/ 30min, respectivamente).

No sêmen incubado na presença de H_2O_2 exógeno, observou-se um aumento nas concentrações de H_2O_2 detectadas no TRIS e TRO em relação às geradas espontaneamente no sêmen, enquanto que no CAT+ e TRO/CAT+ as concentrações detectadas se mantiveram estáveis (Tabela 13, Figura 14). Comparando-se a concentração de H_2O_2 detectada nos quatro tratamentos, observamos que houve diferença significativa (P<0,01; Anexo 6.3) entre eles. A concentração de H_2O_2 detectada no TRIS (18,69 nmol/40 x10^6 spz/30min) foi maior que nos demais tratamentos, sendo que nos meios contendo catalase (CAT+ e TRO/CAT+) foram detectadas concentrações mais baixas (6,76 e 6,00 nmol/40 x10^6 spz/30min), sugerindo que a catalase presente no meio foi capaz de remover o H_2O_2 adicionado ao meio reacional (Tabela 13, Figura 14).

TABELA 13 - Médias ± erro padrão das concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado no sêmen ovino descongelado e no sêmen na presença de H_2O_2 exógeno (100nmol/ml) adicionado ao meio reacional, de acordo com o tratamento. Resultados expressos em nmol de H_2O_2/40 x10^6 espermatozóides/ 30min.

	H_2O_2 (nmol /40 x10^6 spz/30min)	
Tratamento	**Sêmen**	**Sêmen + H_2O_2**
TRIS	$6,97 \pm 0,18^{a\,B}$	$18,69 \pm 0,52^{a\,A}$
TRO+	$6,00 \pm 0,18^{b\,B}$	$14,76 \pm 0,52^{b\,A}$
CAT+	$6,53 \pm 0,18^{ab}$	$6,76 \pm 0,52^{c}$
TRO/CAT+	$6,08 \pm 0,18^{b}$	$6,00 \pm 0,52^{c}$
TOTAL	$6,40 \pm 0,09^{B}$	$11,55 \pm 0,26^{A}$

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha (maiúsculas) ou na mesma coluna (minúsculas), diferem entre si a P<0,05 pelo teste Duncan.
TRIS: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP; **TRO+:** diluidor TRIS aditivado com Trolox, **CAT+:** diluidor TRIS aditivado com catalase, **TRO/CAT+:** diluidor TRIS + Trolox e catalase.

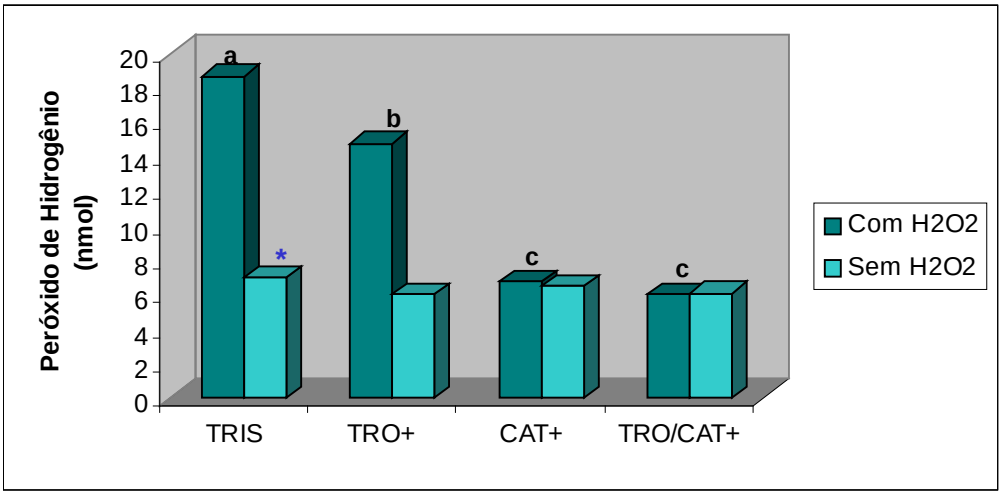


FIGURA 14 - Geração de peróxido de Hidrogênio no sêmen ovino criopreservado nos diluidores TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT+, na presença ou não de H_2O_2 exógeno. Diferenças indicadas por letras sobre as colunas para amostra incubada com H_2O_2 ou * para amostra sem H_2O_2 no TRIS comparado ao TRO+ e TRO/CAT+. (P < 0,05).

6.2.6 Geração de ROS nos Diluidores

A avaliação da capacidade antioxidante inerente dos diluentes também foi realizada e os dados referentes à lipoperoxidação, geração de peróxido de hidrogênio e de superóxido são apresentados nas Tabelas 14, 15 e 16; Figura 15 e Anexos 6.4.

Não houve diferença estatística significativa entre os quatro diluentes ($P<0,05$; Anexo 6.4) nos níveis de TBARS gerados na lipoperoxidação espontânea, ou seja, os níveis de lipoperoxidação foram semelhantes entre os diluidores. No entanto, após a incubação por 15 minutos a 37°C na presença de $FeSO_4$ houve um aumento na lipoperoxidação em todos os diluentes. A produção de TBARS foi significativamente ($P<0,01$, Anexo 6.4) menor nos diluentes TRO+ e TRO/CAT+ (1,49±0,14 e 1,32±0,10 nmol/mL diluidor) que no TRIS e CAT+ (4,78±0,11 e 5,40±0,07 nmol/mL diluidor). O que significa que os diluidores contendo Trolox tiveram uma maior capacidade antioxidante no controle da lipoperoxidação que os demais (Tabela 14).

TABELA 14 - Médias ± erro padrão das concentrações de substancias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) geradas nos diluidores descongelados na lipoperoxidação espontânea (LE) e na lipoperoxidação catalisada por 0,24mmol de $FeSO_4$-$7H_2O$ (LC), de acordo com o tratamento. Resultados expressos em nmol de TBARS/mL diluidor.

	TBARS (nmol /mL diluidor)	
Tratamento	**Diluidor (LE)**	**Diluidor + $FeSO_4$ (LC)**
TRIS	$0,49 \pm 0,10^{B}$	$4,78 \pm 0,11^{b\ A}$
TRO+	$0,51 \pm 0,10^{B}$	$1,49 \pm 0,14^{c\ A}$
CAT+	$0,70 \pm 0,05^{B}$	$5,40 \pm 0,07^{a\ A}$
TRO/CAT+	$0,52 \pm 0,09^{B}$	$1,32 \pm 0,10^{c\ A}$
TOTAL	$0,56 \pm 0,04^{B}$	$3,25 \pm 0,05^{A}$

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha (maiúsculas) ou na mesma coluna (minúsculas), diferem entre si a $P<0,05$ pelo teste Duncan.
TRIS: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP; **TRO+:** diluidor TRIS aditivado com Trolox, **CAT+:** diluidor TRIS aditivado com catalase, **TRO/CAT+:** diluidor TRIS + Trolox e catalase.

A geração de superóxido no diluidor, por si, foi muito baixa (Tabela 15), no entanto, observou-se uma diferença significativa (P< 0,01; Anexo 6.4) na geração desse radical entre os diluidores. A geração de O_2^- foi maior no diluidor TRO/CAT+ (0,196±0,068 nmol/mL diluidor) que nos diluidores TRO+ e CAT+. No entanto foi semelhante á observada no TRIS. Quando se adicionou o sistema HXO ao meio reacional, a geração de O_2^- aumentou em todos os diluidores, no entanto, não houve diferença significativa (P>0,05; Anexo 6.4) entre diluidores, nos níveis de O_2^- gerado. No diluidor TRIS foi 1,94 ± 0,51; no TRO+ 1,08 ± 0,23; no CAT+ 1,09 ± 0,09 e no TRO/CAT+ 1,17 ± 0,07 nmol de O_2^- /mL diluidor.

TABELA 15 - Médias ± erro padrão das concentrações de ânion superóxido (O_2^-) gerado nos diluidores e nos diluidores na presença de O_2^- exógeno gerado pelo sistema hipoxantina-xantina oxidase (HXO), de acordo com o tratamento. Resultados expressos em nmol de O_2^- /mL diluidor.

	O_2^- (nmol/mL diluidor)	
Tratamento	**Diluidor**	**Diluidor + HXO**
TRIS	0,08±0,02$^{ab\ B}$	1,94 ± 0,51 ^{A}
TRO+	0,07±0,03$^{b\ B}$	1,08 ± 0,23 ^{A}
CAT+	0,04±0,01$^{b\ B}$	1,09 ± 0,09 ^{A}
TRO/CAT+	0,19±0,07$^{a\ B}$	1,17 ± 0,07 ^{A}
TOTAL	0,10±0,02 ^{B}	1,32 ± 0,14 ^{A}

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha (maiúsculas) ou na mesma coluna (minúsculas), diferem entre si a P<0,05 pelo teste Duncan.
TRIS: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP; **TRO+:** diluidor TRIS aditivado com Trolox, **CAT+:** diluidor TRIS aditivado com catalase, **TRO/CAT+:** diluidor TRIS + Trolox e catalase.

A produção de H_2O_2 no diluidor foi mais elevada do que a detectada nas amostras de sêmen. Comparando-se a geração de H_2O_2 nos quatro diluidores utilizados no processo de criopreservação, observou-se uma diferença significativa (P<0,05; Anexo 6.4) entre eles. A menor concentração foi detectada no CAT+, a qual foi semelhante à obtida no TRO/CAT+. Os valores detectados nos quatro diluidores foram: 9,02 ± 0,24; 9,11± 0,48; 7,67 ± 0,35 e 8,15 ± 0,33 nmol de H_2O_2/mL/30min, para TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT+, respectivamente (Tabela 16).

TABELA 16 - Médias ± erro padrão das concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pelos diluidores, e nos diluidores na presença de H_2O_2 exógeno (100nmol/ml) adicionado ao meio reacional, de acordo com o tratamento. Resultados expressos em nmol de H_2O_2/mL/30min.

	H_2O_2 (nmol /mL/30min)	
Tratamento	**Diluidor**	**Diluidor + H_2O_2**
TRIS	$9,02 \pm 0,24^{a\,B}$	$15,47 \pm 1,09^{a\,A}$
TRO+	$9,11 \pm 0,48^{a\,B}$	$13,52 \pm 1,05^{a\,A}$
CAT+	$7,67 \pm 0,35^{b}$	$7,93 \pm 0,48^{b}$
TRO/CAT+	$8,15 \pm 0,33^{ab}$	$8,89 \pm 0,27^{b}$
TOTAL	$8,49 \pm 0,18^{B}$	$11,45 \pm 0,40^{A}$

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha (maiúsculas) ou na mesma coluna (minúsculas), diferem entre si a P<0,05 pelo teste Duncan.
TRIS: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP; **TRO+:** diluidor TRIS aditivado com Trolox, **CAT+:** diluidor TRIS aditivado com catalase, **TRO/CAT+:** diluidor TRIS + Trolox e catalase.

Quando a amostra de diluidor foi incubada na presença de100µmol de H_2O_2 exógeno, houve um aumento significativo (P<0,05; Anexo 6.4) na concentração de H_2O_2 detectado nos diluidores TRIS e TRO+ (15,47 ± 1,09 e 13,52 ± 1,05 nmol de H_2O_2/mL/30min, respectivamente) em relação ao CAT+ e TRO/CAT+ (7,93 ± 0,48 e 8,89 ± 0,27 nmol de H_2O_2/mL/30min, Tabela 16). Isso sugere que a catalase presente no diluidor foi capaz de remover o H_2O_2 adicionado ao meio reacional e manter os níveis estáveis em relação ao diluidor, unicamente.

A capacidade antioxidante do diluidor controle (TRIS) é demonstrada no gráfico da Figura 14. O percentual de metabólitos do oxigênio gerados espontaneamente nesse diluidor em relação ao que foi gerado na reação catalisada foi de: 10% dos TBARS, 58% do H_2O_2 e 4% do O_2^- ou seja, o meio foi capaz de remover ou deixou de gerar espontaneamente 90% de TBARS, 42% de peróxido de hidrogênio e 96% de superóxido.

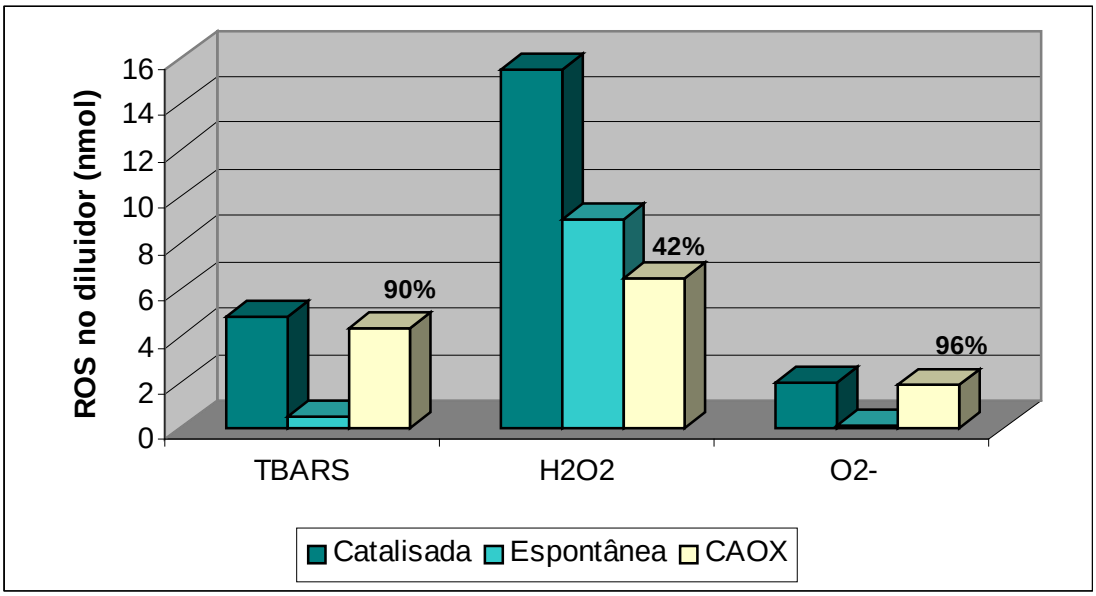


FIGURA 15 - Capacidade antioxidante (CAOX) do diluidor TRIS na remoção de TBARS, H_2O_2 e O_2^-. CAOX é a diferença entre a concentração gerada na reação catalisada (máximo) e na espontânea.

6.3 Discussão

Motilidade espermática

A presença de motilidade é uma característica essencial para que o espermatozóide seja capaz de fecundar o óvulo, pois sem ela o mesmo não pode se deslocar através do sistema genital feminino.

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozóides é de grande importância, devido ao fato de vários parâmetros da cinética espermática terem sido correlacionados com provas de capacidade fertilizante do espermatozóide, como: teste de penetração no muco cervical, penetração em ovócitos de hamster e resultados de fertilização *in vitro* (JANUSKAUSKAS et al., 1999). Além disso, existe uma alta correlação entre a motilidade espermática analisada por computador e na forma subjetiva convencional (KOLIBIANAKIS et al., 1992).

A motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), VAP, VCL, ALH, STR e LIN, após a descongelação, diferiram conforme o diluidor utilizado o que indica que os componentes presentes nos meios atuaram de forma diferente sobre o espermatozóide. A MT, MP, VAP e VCL foram semelhantes entre os espermatozóides criopreservados nos diluidores TRIS e CAT+ e maiores que os valores obtidos no sêmen criopreservado nos diluidores TRO+ e TRO/CAT+. Observou-se que a adição de catalase ao diluente não melhorou esses parâmetros quando comparado ao controle (TRIS), no entanto foi superior em relação à adição de Trolox ou a associação de Trolox e catalase. Existem relatos de que a adição de catalase ao diluente melhorou a motilidade e viabilidade do espermatozóide bovino (KRZYZOSIAK et al., 2000; BILODEAU et al., 2002; ROCA et al., 2005), eqüino (BAUMBER et al., 2002), ovino (MAXWELL & STOJANOV, 1996; UPERTI et al., 1998), e a capacidade fertilizante (*in vitro*) do espermatozóide ovino (MAXWELL & STOJANOV, 1996). No entanto, não exerceu nenhum efeito sobre esses parâmetros no sêmen ovino sexado (GRAFF et al., 2006) e no sêmen de eqüino (BALL et al., 2001). Sendo que a maioria dos estudos acima relacionada foi feita com sêmen armazenado na forma líquida e o estresse oxidativo é muito maior após a criopreservação.

Acontece que o diluidor controle (TRIS) já exercia um efeito muito bom na preservação da motilidade espermática em relação a outros diluidores utilizados na criopreservação do espermatozóide ovino. As motilidades, MT e MP observadas neste estudo, utilizando o TRIS foram superiores às obtidas em vários estudos com o espermatozóide ovino criopreservado no meio Tris-gema aditivado ou não de surfactante e em outros diluentes (MOSES et al., 1995; MAXWELL et al., 1995; SALAMON & MAXWELL, 1995; OLIVEIRA et al., 1988; EL-ALAMY & FOOTE, 2001; BAG et al., 2002a). Talvez por isso a catalase não tenha tido um efeito tão expressivo nos parâmetros MT e MP.

No entanto, os relatos da literatura afirmam o efeito benéfico da adição de catalase ao meio, na prevenção do efeito deletério do H_2O_2 sobre a motilidade espermática. Aitken et al. (1993a) observaram que o H_2O_2, gerado pelo sistema xantina-xantina oxidase (X-XO), exerce efeito deletério nas características de movimento do espermatozóide humano, e que a adição de catalase (100U/mL) ao meio reacional reverteu o efeito citotóxico do sistema X-XO sobre o movimento espermático. No sêmen de bovinos, a adição de pequenas doses de catalase (1 a 5U/ml, BILODEAU et al., 2002; 0,1mg/mL-BLONDIN et al., 1997) é suficiente para proteger o espermatozóide dos danos causados pelo H_2O_2 à sua motilidade. No presente estudo, foi adicionado 50µg/mL o que corresponde a 0,0935U de catalase/mL de diluidor (CAT+ e TRO/CAT+), o suficiente para decompor 0,935µMol de H_2O_2 (935nmol), tais concentrações de H_2O_2 estão bem acima das taxas máximas produzidas pelos espermatozóides nesse experimento. Por outro lado, o meio Tris-gema é considerado um potente removedor de H_2O_2, O_2^- e OH (CHATTERJEE & GAGNON, 2001), o que pode ser devido à atividade de catalase observada na gema de ovo (DESJARDINS & HAFS, 1961). Assim, quando uma pequena quantidade de catalase foi adicionada ao diluidor TRIS contendo 20% de gema de ovo, nenhuma melhora perceptível foi observada na motilidade espermática.

Os níveis mais altos de H_2O_2 foram gerados no sêmen congelado nos diluidores TRIS (controle) e CAT+, os mesmos que tiveram as taxas de motilidade (MT, MP, VAP e VCL) mais altas, demonstrando que as quantidades geradas não foram prejudiciais a motilidade.

Quando espermatozóides humanos normais (não geradores de ROS) foram incubados juntamente com espermatozóides danificados ou afuncionais,

o nível de ROS liberados pelos espermatozóides deficientes presentes na mistura espermática não foi suficiente para ter conseqüências na motilidade dos espermatozóides normais (PLANTE et al., 1994). Por outro lado, níveis muito mais altos de ROS gerados pelo sistema xantina-xantina oxidase afetaram significativamente a motilidade do espermatozóide de várias equino (BAUMBER et al., 2000), humano (AITKEN et al., 1993 a; GRIVEAU et al, 1995) e bovino (BLONDIN et al., 1997; BILODEAU et al., 2002). O mesmo foi observado na presença de neutrófilos ativados, no espermatozóide humano (PLANTE et al., 1994) e eqüino (BAUMBER et al., 2002). Assim, supõe-se que a quantidade de ROS (H_2O_2 e O_2^-) geradas no sêmen ovino criopreservado nos diluidores TRIS e CAT+ sejam próximas dos níveis fisiológicos e por isso não causaram danos à motilidade espermática.

Quanto à ação da catalase, pode-se especular que ela teve algum efeito na preservação da motilidade do espermatozóide ovino após o processo de criopreservação, uma vez que se manteve semelhante ao controle, ou teve um leve aumento no caso da MP. Considerando-se que as concentrações de catalase e GPx, ambas removedoras de peróxido de hidrogênio, no sêmen fresco de ovinos são baixas (MARTÍ et al., 2003) e que, após um ciclo de congelação e descongelação do sêmen bovino, Bilodeau et al. (2000) observaram que os níveis de GPx eram extremamente baixos e a catalase estava ausente nas células espermáticas, demonstrando pouca capacidade para metabolizar o H_2O_2. Se o mesmo ocorrer com o espermatozóide ovino, é possível que a adição de catalase ao diluidor tenha, exibido a capacidade de proteger o espermatozóide do efeito deletério do H_2O_2 sobre os parâmetros da motilidade espermática.

No que diz respeito ao ALH, STR e LIN, a adição tanto de catalase como de Trolox, ao diluidor utilizado na criopreservação, exerceu efeito benéfico em relação ao espermatozóide criopreservado no diluidor TRIS (controle).

Já a adição do Trolox ou da associação Trolox e catalase teve um efeito negativo na MT, MP e VCL, quando comparado ao diluidor só com catalase (CAT+), e apenas a associação Trolox e Catalase (TRO/CAT+) provocou uma redução no VAP em relação ao CAT+. Esse efeito negativo do Trolox em relação aos parâmetros da motilidade espermática não foi surpresa, uma vez que existem muitos relatos controversos sobre o efeito do Trolox ou da

vitamina E na preservação da motilidade espermática em várias espécies. A adição de vitamina E ou Trolox melhorou a motilidade no sêmen ovino (SARLOS et al., 2002) e suíno (PEÑA et al., 2003; BREININGER et al., 2005) ou não teve nenhum efeito sobre a motilidade no sêmen de ovino (UPERTI et al., 1997) e eqüino (BALL et al., 2001). Embora haja variação entre esses estudos quanto às doses utilizadas e a forma de conservação do sêmen.

Integridade de membrana plasmática e acrossomal

A suplementação do diluidor com os antioxidantes Trolox (TRO+) e catalase (CAT+) sozinhos, não na combinação (TRO/CAT+), teve efeito benéfico na integridade de membrana plasmática e acrossomal, avaliado pelas sondas IP e FITC-PSA, em relação ao controle (TRIS). O percentual de espermatozóides viáveis com acrossomo intacto, independente do potencial de membrana mitocondrial (F1+ F2) foi maior no diluidor aditivado de catalase (CAT+) e o percentual de não viáveis com acrossomo reagido (F7 + F8) foi menor, também nos espermatozóides criopreservados no CAT+. Demonstrando que a adição de catalase teve um efeito benéfico na preservação da integridade tanto da membrana plasmática quanto da acrossomal. A adição de Trolox exerceu efeito semelhante ao da catalase, embora em proporção inferior. O efeito benéfico da catalase na preservação da integridade da membrana plasmática e acrossomal do espermatozóide mamífero foi observado no sêmen ovino (MAXWELL & STOJANOV, 1996) e bovino (Krzyzosiak et al., 2000; Roca et al., 2005).

A adição de Vitamina E ao diluidor do sêmen promoveu maior integridade de membrana plasmática no espermatozóide ovino (OLLERO et al., 1996), assim como a associação de Vitamina E com outros antioxidantes proporcionou maior integridade acrossomal (SARLÓS et al., 2002).

A baixa capacidade crioprotetora do diluidor Tris na criopreservação do sêmen ovino também foi observada por Aisen et al (2005). Utilizando um diluidor Tris isotônico, semelhante ao utilizado nesse estudo, embora com menos gema de ovo 10% x 20% e sem detergente, os autores observaram que os danos causados à membrana plasmática durante a criopreservação, foram

significativamente mais altos que nos espermatozóides congelados nos outros diluidores, por eles avaliados.

A ausência de espermatozóides com membrana plasmática intacta e acrossomo lesado ou reagido (F3 e F4), independente do potencial de membrana mitocondrial, está de acordo com os achados de Celeghini (2005), que no sêmen criopreservado de bovinos encontrou menos de 0,5% de espermatozóides nessa categoria. Segundo a autora, esse fato sugere que, após a lesão do acrossomo ou mesmo do processo semelhante à capacitação espermática que ocorre no sêmen criopreservado, a membrana plasmática torna-se permeável e que o período de tempo em que a célula permanece com a membrana plasmática intacta, impermeável ao IP é bastante curto.

A presença de radicais livre no sêmen, nas concentrações detectadas no presente estudo, não causou nenhum efeito na integridade de membrana plasmática e acrossomal. Os níveis de H_2O_2 gerados no sêmen congelado no diluidor CAT+ foram semelhantes ao gerado no controle e os níveis de O_2^- gerados no TRO+ foram superiores ao controle e mesmo assim os maiores percentuais de espermatozóides viáveis com membranas íntegras foram observados no sêmen congelado nos diluidores CAT+ e TRO+. Resultado semelhante foi obtido por Baumber et al., (2000) no sêmen eqüino fresco incubado na presença do sistema gerador de O_2^-/H_2O_2 (X-XO), com e sem catalase, onde a geração de ROS não teve nenhum efeito na porcentagem de espermatozóides vivos com membrana intacta, independente da adição ou não de catalase, comparado com o controle (só espermatozóide). Já no sêmen bovino, a exposição ao H_2O_2 exógeno, durante incubação à temperatura ambiente, provocou uma perda maior da integridade de membrana comparada ao diluente com catalase (KRZYZOSIAK et al., 2000).

Potencial de membrana mitocondrial

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial tem sido usada como forma de medir a função mitocondrial, por causa de sua relação com a síntese de ATP, necessária para a movimentação do espermatozóide.

No espermatozóide de rato Gravance et al., (2001) observaram uma forte correlação entre os padrões de coloração do JC-1 e o percentual de espermatozóides com mitocôndria funcional.

Os padrões de coloração pelo JC-1 também foram correlacionados com motilidade espermática no espermatozóide de rato (GRAVANCE et al., 2001) e ovino (MARTINEZ-PASTOR et al., 2004).

A adição de antioxidantes ao diluidor não melhorou a função mitocondrial, avaliada com o JC-1, em relação ao sêmen criopreservado no diluente controle (TRIS). Após a criopreservação, o número de espermatozóides com alto potencial de membrana mitocondrial foi extremamente baixo em todos os tratamentos (1,22 a 2,26%) sugerindo que a membrana mitocondrial do espermatozóide ovino é uma estrutura muito sensível aos danos causados pelo processo de congelação e descongelação. Windsor & White (1995) utilizando rodamina (R123), demonstraram que o processo de congelação e descongelação provoca severos danos à membrana mitocondrial do espermatozóide ovino e que a exposição do sêmen ao antioxidante BHT, antes da refrigeração, não causou nenhuma alteração no potencial de membrana em relação ao controle. No sêmen de suíno, a porcentagem de espermatozóide com alto potencial de membrana mitocondrial (JC-1), após a descongelação foi muito baixo, entre 0,31 e 0,78%, no entanto a adição de Trolox ao diluidor para criopreservação do sêmen proporcionou aumento nesse parâmetro em relação ao controle (PEÑA et al., 2003).

Neste estudo, nenhuma correlação foi observada entre alto potencial de membrana mitocondrial (APM) e motilidade espermática (APM x MT: r= -0,12; P=0,0894; APM x MP: r= -0,07 P=0,3144), diferindo dos achados de Martinez-Pastor et al., (2004) que, analisando o sêmen ovino descongelado, observaram uma correlação significativa entre alto potencial de membrana mitocondrial, avaliado pelo JC-1 (citometria de fluxo), e motilidade total (r=0,33) e motilidade progressiva (r=0,40).

Quanto ao efeito dos ROS, os dados da literatura demonstraram que essa estrutura espermática não é significativamente afetada por concentrações fisiológicas de H_2O_2 no espermatozóide humano (ARMSTRONG et al., 1999) nem por concentrações elevadas geradas pelo sistema X-XO no espermatozóide eqüino (BAUMBER et al., 2000). O percentual de

espermatozóides com alto potencial de membrana mitocondrial (2,26%) foi maior no diluidor TRIS, o mesmo tratamento que teve os mais altos níveis de H_2O_2, gerados no sêmen, sugerindo que o mesmo não exerceu efeito deletério sobre a membrana mitocondrial.

Lipoperoxidação

Os níveis de lipoperoxidação (LPO) no sêmen criopreservado, na reação catalisada por $FeSO_4$, foram semelhantes aos observados por Aisen et al., (2005) no espermatozóide ovino criopreservado e inferiores aos resultados obtidos tanto na LPO espontânea quanto na catalisada por $FeSO_4$ no espermatozóide ovino oriundo do sêmen fresco por Kasimanickam et al. (2006) e Sarlós et al. (2002), todos utilizando o método do ácido tiobarbitúrico (ensaio TBA). Em relação a LPO do espermatozóide ovino obtido após lavagem do sêmen fresco e incubado a 37°C por 30 minutos na presença de $FeSO_4$, Sarlós et al. (2002) obtiveram 25,89nmol de MDA/10^9 espermatozóides, enquanto que neste estudo, após 15 minutos de incubação a 37°C com $FeSO_4$, a concentração média de TBARS geradas no sêmen foi de 2,83nmol/10^8 espermatozóides. No espermatozóide re-suspenso em diluidor Tris, semelhante ao utilizado neste estudo, após 30 minutos de incubação a 37°C, sem $FeSO_4$, Sarlós et al. (2002) obtiveram 25,63nmol de MDA/10^9 espermatozóides, enquanto que na LPO espontânea no sêmen criopreservado no diluidor TRIS, obteve-se apenas 1,16nmol de TBARS/10^8 espermatozóides. Já Kasimanickam et al. (2006) obtiveram uma concentração de MDA de cerca de 4,39 μmol/10^9 espermatozóides. Essas diferenças na produção de malonaldeído ou de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico entre os ensaios, possivelmente se devem às diferentes concentrações de espermatozóides nas amostras, a duração do período de incubação, bem como, à adição de hidroxitolueno butilatado (BHT) ao meio reacional, imediatamente antes do aquecimento, que foi adotada no presente estudo. Essa alteração se deve ao fato de Buege & Aust (1978) terem relatado que os lipídios das amostras sofrem auto-oxidação catalisada por íons metais durante o aquecimento com o ácido tiobarbitúrico e que a mesma pode ser evitada

adicionando-se 0,01% de BHT ao meio reacional. Procedimento semelhante também foi adotado por Lapenna et al. (2001), que relatam que o método TBA favorece a liberação de precursores de TBARS a partir da oxidação de proteínas e aldeídos ligados a proteínas (reação favorecida pelo ferro), gerando mais TBARS na amostra. Assim, a minimização da interferência de todos esses fatores pode justificar os índices de lipoperoxidação, mais baixos observados no sêmen ovino neste estudo em relação àqueles realizados nas amostras de sêmen fresco (SARLÓS et al., 2002; KASIMANICKAM et al., 2006), uma vez que Aisen et al., (2005) também utilizaram BHT no meio reacional.

O nível de lipoperoxidação nas amostras de sêmen, imediatamente após a descongelação, foi semelhante em todos os tratamentos, demonstrando que nestas condições experimentais, todos eles foram capazes de inibir a lipoperoxidação excessiva. O que pode expressar tanto a capacidade antioxidante do próprio sêmen (espermatozóides e plasma seminal), como o efeito protetor adicional oferecido pelos diluidores. A pressuposta inibição da lipoperoxidação foi confirmada quando adicionou-se um catalisador ($FeSO_4$) ao meio reacional e a geração de TBARS aumentou em todos os tratamentos, indicando que todos os sistemas tinham disponibilidade de hidroperóxido de lipídios, com os quais iniciar a reação em cadeia da lipoperoxidação e que a mesma não ocorreu espontaneamente. O efeito protetor dos diluidores independente da adição ou não de antioxidantes, pode ser atribuído à presença de gema de ovo em todos eles, que embora ofereça substrato lipídio para a lipoperoxidação, também exerce efeito antioxidante (DESJARDINS & HAFS, 1961). Jones & Mann (1977) demonstraram que a gema de ovo protegeu o espermatozóide ovino do efeito deletério dos peróxidos de lipídios, embora o mecanismo pelo qual ela exerce essa proteção não tenha sido esclarecido. Aisen et al. (2005) também não observaram diferenças nos níveis de lipoperoxidação, imediatamente após a descongelação, entre os espermatozóides ovinos criopreservados em três diluentes (Tris isotônico, trealose hipertônico ou trealose + EDTA hipertônico).

Na lipoperoxidação catalisada pelo ferro ($FeSO_4$), o nível de TBARS foi significativamente mais baixo nos tratamentos que continham Trolox no meio (TRO+ e TRO/CAT+) demonstrando a habilidade do Trolox para inibir a propagação do processo de lipoperoxidação. O mecanismo de ação do efeito

antioxidante do Trolox é semelhante ao da vitamina E, ou seja, ele atua removendo os radicais peroxil, interrompendo a reação em cadeia da lipoperoxidação (ALBERTINI & ABUJA, 1999). A habilidade da vitamina E (α-tocoferol) na inibição da lipoperoxidação da membrana espermática já foi demonstrada no sêmen de varrão na forma líquida (CEROLINE et al., 2000) e criopreservada (BREININGER et al., 2005), e no sêmen criopreservado de bovino (BECONI et al., 1993). No sêmen de carneiros, Jones & Mann (1976) observaram que a concentração de MDA gerado no sêmen incubado na presença de 4mg de α-tocoferol, foi significativamente mais baixo (~5nmol/10^9 espermatozóides) do que na amostra controle (116nmol/10^9 espermatozóides).

Superóxido

Comparando-se as concentrações de O_2^- detectadas no sêmen, com as detectadas no diluidor, observou-se que houve um aumento na geração de superóxido no sêmen criopreservado em todos os diluidores. No entanto, como o O_2^- não atravessa facilmente a membrana (NORBERG & ARNER, 2001, HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1999), isso sugere que ocorreu uma geração extracelular de O_2^- pelo espermatozóide ovino.

Resultados obtidos em alguns estudos indicam que o espermatozóide de mamífero é capaz de gerar superóxido por um sistema enzimático localizado na membrana plasmática que utiliza NAD (P)H como substrato. Esta fonte de geração de O_2^- foi confirmada no espermatozóide de rato (VERNET et al., 2001), de homens (AITKEN & CLARKSON, 1988; AITKEN, 1995; DE LAMIRANDE et al., 1997; AITKEN et al.. 2003) e de cavalos (SABEUR & BALL, 2006). Esse sistema enzimático envolve a atividade da enzima de superfície celular NADH oxidase que elimina seus produtos no meio extracelular (AITKEN & CLARKSON, 1988; AITKEN, 1995; DE LAMIRANDE et al., 1997; VERNET et al., 2001; AITKEN et al., 2003). Sendo assim, pode-se dizer que houve geração de O_2^- pelo espermatozóide ovino liberado para o meio extracelular, uma vez que os níveis detectados no sêmen congelado em todos os diluidores foram mais altos do que os observados apenas no diluidor.

A geração de superóxido no sêmen foi influenciada pelo diluidor utilizado na criopreservação, sendo que a maior concentração de superóxido foi gerada no sêmen congelado nos diluidores com Trolox. Fato que pode ser explicado pela ocorrência de uma auto-oxidação do trolox (hidroxila do grupo fenol) na presença de O_2 gerando O_2^-, que, em seguida, oxida o Trolox, dando início a uma reação em cadeia. Albertini & Abuja (1999) demonstraram que durante a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o Trolox pode atuar tanto como antioxidante como pró-oxidante, e que a presença de íons metais (Cu^{2+}) é fundamental para que ele tenha efeito oxidante. Assim, como é praticamente impossível ter soluções laboratoriais completamente livres da contaminação com íons metais, como cobre e ferro, associado à presença de gema de ovo no diluente, que é uma fonte de ferro, é possível que essa auto-oxidação do Trolox, catalisada por íons metálicos, tenha ocorrido.

Na presença do sistema gerador de O_2^-, hipoxantina-xantina oxidase (HXO) a geração de O_2^- aumentou significativamente, no sêmen congelado no diluidor contendo a associação de Trolox e catalase (TRO/CAT+). Semelhante ao sistema X-XO (AITKEN et al., 1993a) o sistema hipoxantina-xantina oxidase também produz H_2O_2 que pode ser removido adicionando catalase ao meio reacional (SUZUKI, 2000). Avaliando a cinética da geração de radicais livres pelo sistema xantixa-xantina oxidase, Aitken et al., (1993a) observaram que a adição de catalase ao sistema resultou em aumento na geração de O_2^-. Sendo assim, como o diluente TRO/CAT+ contém catalase, é possível que uma maior quantidade de O_2^- tenha sido gerada, somando-se a isso o efeito do Trolox na geração de O_2^-, pode explicar a maior concentração de O_2^- detectada nesse diluidor.

Peróxido de Hidrogênio

A geração de H_2O_2 foi menor no sêmen criopreservado nos diluidores contendo Trolox. Ao que parece houve uma competição por substrato para a oxidação mediada pela peroxidase. Nakamura & Hayashi (1992) observaram que a hidroxila presente no grupamento fenólico do Trolox é facilmente oxidada pela horseradish peroxidase, na presença de peróxido de hidrogênio. Assim, além de promover a oxidação do phenol red, a peroxidase também promoveu a

oxidação do Trolox. Como o ensaio baseia-se na oxidação phenol red pelo H_2O_2, catalisada pela peroxidase e parte da peroxidase disponível foi usada na oxidação do Trolox, uma menor quantidade de H_2O_2 foi detectada nos diluidores contendo Trolox. Por outro lado, comparando-se a geração de superóxido e peróxido de hidrogênio no sêmen criopreservado nos quatro diluidores, observou-se que a menor geração de O_2^- ocorreu no TRIS e CAT+, enquanto que a maior geração de H_2O_2 foi observada exatamente nos mesmos tratamentos, sugerindo que ocorreu dismutação espontânea de O_2^- para H_2O_2.

Quando o sêmen foi incubado na presença de H_2O_2, observou-se que a catalase presente no diluidor foi altamente eficaz em remover o H_2O_2 exógeno, mantendo as concentrações significativamente mais baixas do que nos outros tratamentos. No entanto, esse efeito não foi tão evidente na geração espontânea de peróxido de hidrogênio no sêmen criopreservado nos quatro diluidores. Possivelmente, isso se deva ao fato de que a catalase não atravessa a membrana celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999) e, portanto, só remove o H_2O_2 liberado para o meio extracelular. Plante et al., (1994) observaram que apenas um terço dos ROS produzidos pelo espermatozóide são liberados no meio extracelular. Considerando-se que o processo de criopreservação acarreta um certo grau de estresse oxidativo para o espermatozóide, resultando no aumento da geração de ROS, pode-se dizer que os níveis de H_2O_2 detectados no sêmen, durante a geração espontânea, representam apenas uma porção do que foi produzido durante o processo de congelação e descongelação e que parte deles foi removida pela catalase presente no diluidor. Assim, tanto a catalase adicionada ao diluidor quanto a presente na gema de ovo foram eficazes em remover a quantidade de peróxido de hidrogênio liberado pelo espermatozóide de maneira igualmente eficaz e, por isso, não foi observada nenhuma diferença nas concentrações de H_2O_2 entre os quatro diluentes.

Porém, quando uma alta concentração de H_2O_2 (100μmol) foi adicionada ao meio, a catalase presente nos diluidores CAT+ e TRO/CAT+ removeu o excesso de H_2O_2, mantendo os níveis semelhantes ao gerado espontaneamente no sêmen, fato que não foi observado nos diluidores sem catalase, sugerindo que a catalase presente na gema não é suficiente para remover altas concentrações de peróxido de hidrogênio.

Geração de ROS no diluidor

Reações que geram radicais livres ocorrem no meio sozinho, independente da presença de células (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004). Por essa razão, os níveis de lipoperoxidação e a geração de superóxido e peróxido de hidrogênio foram avaliados nos quatro diluentes.

A contribuição do diluidor nos níveis de TBARS gerados no sêmen foi baixa, uma vez que, na ausência de um catalisador, todos os diluidores geraram baixo nível de TBARS. Na lipoperoxidação catalisada por $FeSO_4$ observou-se um aumento nos níveis de TBARS em todos os diluidores, sendo que a mesma foi significativamente mais baixa nos diluidores contendo Trolox (cerca de quatro vezes menor que nos diluidores sem Trolox), demonstrando que a concentração de Trolox presente no diluidor teve um efeito antioxidante e foi eficaz em proteger os lipídios contra a peroxidação.

A geração de anion superóxido foi muito baixa em todos os diluidores. No entanto, a concentração mais alta observada no TRO/CAT+, possivelmente, se deve às mesmas causas que explicam o aumento da geração desse radical no sêmen. A adição do sistema HXO provocou aumento nas concentrações de O_2^- em todos os diluidores, demonstrando que nenhum deles foi mais eficaz em remover superóxido do meio.

A geração de peróxido de hidrogênio nos quatro diluidores estudados foi mais elevada do que a observada no sêmen criopreservado nos mesmos diluidores. Isso significa que embora os diluidores tenham contribuído como fonte geradora de radicais livres durante a criopreservação do sêmen, a interação sêmen diluidor durante o processo de criopreservação foi positiva, ou seja, na presença de espermatozóides e plasma seminal, os níveis se mantiveram mais baixos do que no diluidor sozinho, o que demonstra a capacidade antioxidante do próprio sêmen em remover peróxido de hidrogênio gerado.

Uma alta produção de H_2O_2 no diluidor Tris-gema-glicerol, utilizado para a criopreservação de sêmen bovino, foi observada por Morani (2004). Portanto, talvez essa seja uma característica dos diluidores á base de Tris utilizados na criopreservação do sêmen de várias espécies.

Na ausência de uma fonte externa de estresse oxidativo, a geração de peróxido de hidrogênio foi menor no diluidor com catalase (CAT+) e, mesmo quando se adicionou 100µmol de H_2O_2 ao meio, as concentrações detectadas foram significativamente mais baixas nos diluidores contendo catalase. Isso demonstra que a catalase foi altamente eficaz em remover tanto o peróxido de hidrogênio gerado por reações químicas entre os componentes do diluidor quanto o H_2O_2 exógeno adicionado ao meio. Porém, esse efeito da catalase não foi tão evidente no diluidor TRO/CAT+, onde a concentração de peróxido de hidrogênio foi ligeiramente maior do que a detectada no CAT+. Isso pode ser explicado pelo fato de que o O_2^- gerado pelo Trolox, como explicado anteriormente, está sendo convertido para H_2O_2 rápido demais para a catalase conseguir fazer uma remoção eficiente, levando a um acúmulo de parte do H_2O_2 gerado.

O diluente controle não foi completamente neutro quanto à remoção do H_2O_2, O_2^- e TBARS, uma vez que conseguiu manter a geração de ROS em níveis semelhantes aos observados nos diluidores com antioxidantes, embora tivesse alta disponibilidade de substrato para gera-los, como observado na presença de catalisadores. Espontaneamente, gerou apenas 45, 4 e 10%, respectivamente, das concentrações de cada radical gerados por reações químicas no sistema gerador (Figura 14). Chatterjee & Gagnon (2001) relataram que o diluidor Tris-gema-glicerol é um potente removedor de ROS, removendo 70% do H_2O_2 adicionado ao meio e mais de 50% do O_2^- gerado. Já Bilodeau et al. (2002) mostraram que o diluidor Tris-gema-glicerol teve uma baixa capacidade antioxidante em comparação com o meio TALP, para neutralizar H_2O_2 adicionado ao meio e ROS gerados indiretamente a partir do H_2O_2.

Provavelmente, a gema de ovo presente no meio tenha exercido uma ação antioxidante, Desjardins & Hafs (1961) detectaram a presença de atividade catalase na gema de ovo fresca, capaz de degradar peróxido de hidrogênio e Jones & Mann (1977) demonstraram que a gema de ovo protege o espermatozóide de carneiros do efeito deletério dos peróxidos de lipídios.

6.4 Conclusões

A adição de catalase ao diluidor Tris-gema utilizado nesse experimento, melhorou a viabilidade do espermatozóide ovino após a congelação;

Ocorre lipoperoxidação, produção de peróxido de hidrogênio e geração de superóxido no sêmen ovino, após um ciclo de congelação e descongelação;

Os antioxidantes, Trolox-C e catalase podem ser indicados para uso nos diluidores para criopreservação do sêmen ovino. No entanto, a concentração ideal de Trolox ainda deve ser determinada, uma vez que nas concentrações utilizadas seu efeito antioxidante não foi tão evidente quanto o da catalase.

A associação de catalase e trolox ao diluidor, tem efeito deletério sobre a motilidade espermática e sobre a integridade acrossomal, o que não acontece, quando utilizados isoladamente;

Ocorre produção de ROS no diluidor, sem a presença de células. Portanto, a geração de produtos oxidantes nos diluidores para criopreservação de sêmen deve ser avliada para evitar os efeitos tóxicos desses compostos sobre o espermatozóide e ajudar a formular diluidores melhores, quanto às suas propriedades antioxidantes.

7- CONCLUSÃO GERAL

Os resultados apresentados demonstram que a adição de detergente e antioxidante ao diluidor Tris-gema, melhorou o efeito crioprotetor do meio durante a congelação do espermatozóide ovino;

As propriedades antioxidativas dos diluentes usados rotineiramente para criopreservação do sêmen são pouco conhecidas e, como ficou demonstrado, ocorre produção de ROS no diluidor a apartir das reações químicas entre os compostos presentes no meio e dependendo da quantidade produzida, esses ROS podem exercer efeito tóxico sobre o espermatozóide. Esse conhecimento é fundamental para que se possa entender como a viabilidade espermática será afetada em determinado diluidor, após o estresse oxidativo resultante da criopreservação, bem como ajudará a formular diluidores melhores quanto às suas propriedades antioxidativas e crioprotetoras;

Outros estudos deverão ser realizados para verificar se os diluidores testados terão alguma influência na fertilidade após a inseminação artificial.

8- REFERÊNCIAS

ABOAGLA, E. M.-E. & TERADA, T. Effect of the supplementation of trehalose extender contain egg yolk with sodium dodecyl sulfate on freezability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.809-818, 2004a

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

AHMAD, K. & FOOTE, R.H. Post thaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated with antibiotics and detergent. **Journal of Dairy Science**, v.69, n.2, p.535-541, 1986.

AISEN, E.G.; ALVAREZ, H.L.; VENTURINO, A.; GRADE, J.J. Effect of treahalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, v.53, p.1053-1061, 2000.

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. **Theriogenology**, v.57, p.1801-1808, 2002.

AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, p.239-249, 2005.

AITKEN, R, J; CLARKSON, J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 59-469, 1987.

AITKEN, R, J; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of a xanthine oxidase free radical generation system to investigate the citotoxic effect of reactive oxygen

species on human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.97, n.2, p.441-450, 1993a.

AITKEN, R, J; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, n.1, p.257-265, 1993.

AITKEN, R, J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development,** v. 7, p. 659-668, 1995.

AITKEN, R, J; BUCKINGHAM, D.W.; CARRERAS, A.; IRVINE, D.S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radical Biology & Medicine**, v.21, n.4, p.495-504, 1996.

AITKEN, R.J.; RYAN, A.L.; CURRY, B.J.; BAKER, M.A. Multiple forms of redox activity in populations of human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.9, n.11, p. 645-661, 2003

AITKEN, R, J. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology**, v.29, p.69-75, 2006.

AKOURKI, A.; GIL, L.; ECHEGARAY, A.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; DE BASS, I.; GONZALEZ, N.; GALLEGOS DE LA HOYA, M.; MEQUE, L.C. Effect of the extender supplement Equex-STM on cryopreserved semen in the Assaf sheep. **Cryo Letters**. v.25, n.2, p.147-154, 2004.

ALBERTINI, R & ABUJA, P.M. Prooxidant and antioxidant proprieties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. **Free Radical Research**, v.30, n.3, p. 181-188, 1999.

ANEL, L.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C. A; BOIXO, J.C.; MANSO, A; GONZÁLEZ, M.; KAABI, M.; ANEL, E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram sêmen. **Theriogenology**, v.60, p.1293-1308, 2003.

ARIOLA, J. & FOOTE, R.H. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.8, p.1664-1670, 1987.

ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W.J.; SIKKA, S.C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.7/8, p. 869-880, 1999.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of n-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.6, p.593-597, 1989.

AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.185-192, 1997.

AZEVEDO, H.C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozóides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoleico e a-lactoalbumina**. Botucatu, 2006. 218p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.

BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S.M.K.; RAWAT, P.S.; MITTAL, J.P. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.72, p.175-183, 2002.

BAG, S.; JOSHI, A.; RAWAT, P.S.; MITTAL, J.P. Effect of initial freezing temperature on semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical enviroment. **Small Ruminant Reserch**, v.43, p.23-29, 2002b.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 1-7, 2000.

BAKER, H.W.G.; CLARKE, G.N. Sperm morphology: consistency of assessement of the same sperm by different observers. **Clinical Reproduction and Fertility**, v.5, p. 37-43, 1987.

BAKER, M.A.; KRUTSKIKH, A.; AITKEN, R.J. Biochemical entities involved in reactive oxygen species generation by human spermatozoa. **Protoplasma**, v.221, p.145-151, 2003.

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary research**, v.62, n.4, p.508-515, 2001a.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5ºC. **Theriogenology**, v. 56, p.577-589, 2001.

BARCLAY, L.R.C.; ARTZ, J.D.; MOWAT, J.J. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: ^{14}C tracer and product studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1237, p.77-85, 1995.

BAUMBER, J.; BALL, B.A; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitocondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n.6, p.895-902, 2000.

BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p.1025-1033, 2002.

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.

BECONI, M.T.; FRANCIA, C.R.; MORA, N.G.; AFFRANCHIO, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v.40, p.841-851, 1993.

BEORLEGUI, N.; CETICA, P.; TRINCHERO, G.; CÓRDOBA, M.; BECONI, M. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. **Andrologia**, v.29, n.1, p.37-42, 1997.

BIELSKI, B.H.J.; SHIUE, G.G.; BAJUK, S. Reduction of nitro blue tetrazolium by CO_2^- and O_2^- radicals. **The Journal of Physical Chemistry**, v.84, p.830-833, 1980.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, n.3, p.282-288, 2000.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE,S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H_2O_2 – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p.275-288, 2001.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRAD, M-A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, p.1105-1122, 2002.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRAD, M-A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v.18, n.4, p.454-460, 1997.

BOLLE, P.; EVANDRI, M.G.; SASO, L. The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. **Contraception,** v.65, p.313-315, 2002.

BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; O'FLAHERTY, C.M.; BECONI, M.T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v.63, n.8, p.2126-2135, 2005

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. **The FASEB Journal**, v.13, p. 1145-1155, 1999.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-310, 1978.

BYRNE, G.P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; BOLAND, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p.265-275. 2000.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopresrvação do sêmen bovino sobre a membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP,Pirasununga.

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

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.452-458, 2001.

COLAS, G. Effect of initial freezing temperature, addition of glicerol and diluition on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.42, p.277-285, 1975.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in artificial insemination program. **Theriogenology**, v.48, p.721-731, 1997.

CORT, W.M.; SCOTT, J.W.; ARAUJO, M.; MERGENS, W.J.; CANNALONGA, M.A.; OSCADA, M.; HARLEY, H. PARRISH, D.R.; POOL, W.R. Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. **Journal of the American Oil Chemist's Society,** v.52, n.6, p.174-178, 1975.

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

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive Oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v.2, p.48-54, 1997.

DE LAMIRANDE, E & GAGNON, C. The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function. In: Gagnon, C. **The male gamete: from basic science to clinical application**. Vienna, IL : Cache River Press, 1999. p. 455- 467.

DESJARDINS, C. & HAFS, H.D. Enzymatic degradation of hydrogen peroxide in egg yolk. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p. 1183, 1961.

DURU, N.K.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.74, n.6, p.1200-1207, 2000.

EL-ALAMY, M.A.; FOOTE, R.H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p.245-254, 2001.

ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v.31, n.1, p.17-22, 1999.

ERICSSON, S.A.; GARNER, D.L.; REDELMAN, D.; AHMAD, K. Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two flow cytometric systems. **Gamete Research**, v. 22, p.355-368, 1989.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira,** v.43, n.1, p.1-16, 1997.

FOLEY, R. **Os humanos antes da humanidade: uma perspectiva evolucionista**. Tradução Patrícia Zimbres. São Paulo: Editora UNESP, 2003. p. 37.

FOOTE, R.H. & ARRIOLA, J. Motility and fertility of bull sperm frozen-thawed differently egg yolk and milk extenders containing detergent. **Journal of Dairy Science,** v.70, n.12, p.2642-2647, 1987.

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.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v.34, p. 127-138, 1986.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium iodide. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 276-284, 1995.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ,H. Influence of extender, temperature and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v.59, p.1241-1255, 2003.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, M.C. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction Fertility and Development**, v.9, p.481-487, 1997.

GILLAN, L.; & MAXWELL, W.M.C. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **Journal of Reproduction and Fertility ,** suppl. 54, p.271-283, 1999.

GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction, Fertility and Development,** v.16, p.447-454, 2004.

GRAAF, S.P.; EVANS, G.; GILLAN, L.; GUERRA, M.M.P.; MAXWELL, W.M.C.; O'BRIEN, J.K. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology** (2006), doi: 10.1016/j.theriogenology. 2006.07.008. Disponivel em: www.sciencedirect.com

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial funtion using flow citometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p.55-64, 1990.

GRAVANCE, C.G.; LEWIS, K.M; CASEY, P.J. Computer automed sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.44, p.989-1002, 1995.

GRAVANCE, C.G.; DUANE, L.G.; MILLER, M.G.; BERGER, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, v.15, p.5-10, 2001.

GREEN, C.E. & WATSON, P.F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, n.122, p.889-898, 2001.

GRIVEAU, J.F.; DUMONT, E.; RENARD, P.; CALLEGARI, J.P.; Le LANNOU, D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, n.1, p. 17-26, 1995.

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

HALLIWELL, B. & WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, p.231-255, 2004.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing - observation with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v.46, p.1086-1094, 1992.

IRVINE, D. S.; JEREMY, P.T.; GORDON, E.L.; FULTON, N.; MILNE, P.A.; AITKEN, R.J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. **Journal of Andrology**, v.21, n.1, p. 33-44, 2000.

JENTZSCH, A.M.; BACHMANN, H.; FÜRST, P.; BIESALSKI, H.K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, n.2, p. 251-256, 1996.

JONES, R. & MANN, T. Lipid peroxides in spermatozoa: formation, role of plasmalogen and physiological significance. **Proceedings R. Soc. Lond. B. Biol. Sci**. v.193, p.317-333, 1976.

JONES, R.; & MANN, T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility,** v.50, n.2, p. 255-260, 1977.

JONES, K.H.; SENEFT, J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate – propidium iodide. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.33, n.1, p.77-79, 1985.

JÓZWIK, M.; JÓZWIK, M.; KUCZYNSKI, W.; SZAMATOWICZ, M. Nonenzymatic antioxidant activity of human seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v.68, n. 1, 1997.

KASIMANICKAM, R.; PELZER, K.D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W.S.; THATCHER, C.D. 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.

KOLIBIANAKIS, E.M.; TARLATZIS, B.C.; BONTIS, J.; PAPADIMAS, J.; SPANOS, E.; MANTALENAKIS, S. Evaluation of Hamilton-Thorn automated semen analysis system. **Archives of Andrology**, v.28, p.213-222, 1992.

KRZYZOSIAK, J. EVENSON, D.; PITT,C.; JOST, L.; MOLAN, P.; VISHWANATH, R. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction, Fertility and Development**, v.12, p. 251-261, 2000.

JONES, A.R. Chemical interference with sperm metabolic pathways. **Journal of Reproduction and Fertility suppl**., v. 53, p. 227-234, 1998.

LAPENNA, D.; CIOFANI, G.; PIERDOMENICO, S.D.; GIAMBERARDINO, M.A.; CUCCURULLO, F. Reaction condictions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid preoxides in human plasma. **Free radical Biology & Medicine**, v.31, n.3, p. 331-335, 2001.

LAPOINTE, S.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M-A. Binding of a bovine oviductual fluid catalase to mammalian spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.58, n.3, p.747-753, 1998.

LAPOINT, J.; BILODEAU, J-F. Antioxidant defenses are modulated in cow oviduct during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1157-1164, 2003.

LIEBLER, C.D. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. **Critical Reviews in Toxicology**, v.23, n.2, p.147-169, 1993.

McLAUGHLIN, E.A.; FORD, W.C.L. Effects of cryopreservation on the intracellular calcium concentration of human spermatozoa and its response to progesterone. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.241-246, 1994.

MARTÍ, J.I.; MARTÍ, E.; CEBRIÁN-PÉREZ, MUIÑHO-BLANCO. Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa alter diluition with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. **Theriogenology**, v.60, p.1025-1037, 2003.

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.121-133, 2004.

MAXWELL, W.M.C.; LANDERS, A.J.; EVANS, G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. **Theriogenology**, v.43, n.7, p.1201-1210, 1995.

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.

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

MAXWEEL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p.1165-1178, 1997.

MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G.; MORTIMER, S.T.; GILLAN, L.; GELLATLY, E.S. McPHIE, C.A. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. **Reproduction Fertility and Development**, v. 11, p.123-126, 1999.

MAXWEEL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1353-1362, 1999.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American Journal of Physiology,** v.247, n.3, pt.1, p. C125-C142, 1984.

MEDINA, V.H. **Uso de sondas fluorescents na avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozóides ovinos recém colhidos e submetidos a congelação**. 1995. 89p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

MILLER, D.J.; DEMERS, J.M.; BRAUNDMEIER, A.G.; BEHRENS, M.L. The use of two fluorescent dyes to identify sperm in a competitive binding assay to oocytes. **Journal of Andrology**, v.19, n. 6, p. 650-656, 1998.

MISRO, M.M.; CHOUDHURY, L.; UPRETI, K.; GAUTAM, D.; CHAKI, S.P.; MAHAJAN, A. S.; BABBAR, R. Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative streee in subjects presenting a normal semen profile. **International Journal of Andrology**, v.27, p.82-87, 2004

MORANI, E.S. **Quantificação dos radicais livres produzidos nas diferentes etapas do processo de criopreservação do sêmen de touros**. 2004. 79p. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Jaboticabal.

MOSES, D.F.; DE LAS HERAS, M.A; VALCÁRCE, A.; PÉREZ, L.; BALDASSARRE, H. Use of computerized motility analyzer for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. **Andrologia**, v.27, p.25-29, 1995.

NAKAMURA, M. & HAYASHI, T. oxidation mechanism of vitamin E analogue (Trolox C, 6-hydroxy-2,2,5,7,8-pentamethylchroman) and vitamin E by horseradish peroxidase and myoglobin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.299, n.2, p.313-319, 1992.

NORDBERG, J. & ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

NEILD, D.M.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B.; AGÜERO, A.; BROUWERS, J.F.H.M. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, p.295-298, 2002.

O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M.T. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **International Journal of Adrology**, v.26, p.109-114, 2003.

OLIVEIRA, J.F.C.; NEVES, J.P.; LUZ. Utilização de orvus es paste e beta-amilase no congelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.12, n.2, p.107-113, 1988.

OLLERO, M.; BLANCO, T.M.; LÓPEZ-PÉREZ, M.J.; PÉREZ, J.A.C. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation reveled by counter-current distribution in an aqueous two-phase system: effect of differents cryoprotectants. **Journal of Chromatography B**, v.680, p.157-164, 1996.

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

PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTINEZ, H.R. 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.

PÉREZ, L.J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; MOSES, D.; BALDASSARRE, H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v.46, p.131-140, 1996.

PICK, E. & KEISARI, Y. A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological Methods**, v.38, n. 1-2, p.161-170, 1980.

PLANTE, M.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. **Fertility and Sterility**, v.62, n.2, p.387-393, 1994.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.169, p.626-627, 1949.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicador of membrane potencial. **Biochemistry**. v.30, n. 18, p.4480-4486, 1991.

REZK, B. M.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DER VIJGHA, W.J.F.; BAST, A. The extraordinary antioxidant activity of vitamin E phosphate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1683, p. 16– 21, 2004.

ROCA, J.; RODRÍGUEZ, M.J.; GIL, M.A.; CARVAJAL, G.; GARCIA, E.M.; CUELLO, C.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E. A. 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.

RODELLO, L. **Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino.** 2006. 70p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.

SABEUR, K. & BALL, B.A. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, n.4, p.701-706, 2006.

SAGACH, V.F.; SCROSATI, M.; FIELDING, J.; ROSSONI, G.; GALLI, C.; VISIOLI, F. The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage *in vitro* and *ex vivo*: a comparison with vitamin E. **Pharmacological Research**, v.45, n.6, p.435-439, 2002.

SALAMON, S. The survival of ram espermatozoa following pellet freezing below -79ºC. **Australian Journal of Biology Science**, v.23, p. 459-468, 1970.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p.185-249, 1995.

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

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p. 689-696, 1997.

SANOCKA, D.; KURPISK, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2:12, 2004. Disponível em: http://www.rbej.com/content/2/1/12. Acesso em 21 ago. 2005.

SARLOS, P.; MOLNAR, A.; KOKAI, M. GABOR, G.Y.; RÁTKY,J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.50, n.2, p.235-245, 2002.

SCOTT, J.W.; CORT, W.M.; HARLEY, H.; PARRISH, D.R.; SAUCY, G. 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society,** v.51, p.200-203, 1974.

SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v.48, n.6, p.835-850, 1996

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

SOUSA, D.B. **Viabilidade do sistema EquitainerÒ na refrigeração do sêmen ovino avaliado pela análise computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial.** 2002. 103p. Dissertação

(Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.

SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science**, v.46, p. 89-96. 1997.

SUZUKI, K. Superoxide-generating system. In: TANIGUCHI, N.; GUTTERIDGE, M.C. **Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species**. New York: Oxford University Press Inc., 2000. P.28-29.

TAO, J.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. **Molecular Reproduction and Development**, v.36, p. 183-194,1993.

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, v. 42, n.1, p.87 – 91, 1984.

THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1531-1550, 2006.

UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M.; MUNDAY, R.; SMITH, J.F. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 269-278, 1997.

UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; DUGANZICH, D.M.; VISHWANATH, R.; SMITH, J.F. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, v. 51, p. 275-287, 1988.

VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A. PÉREZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Assessement of the acrossomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lecitin/hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p.299-309, 1997.

VERNET, P.; FULTON, N.; WALLACE, C.; AITKEN, R.J. Analysis of reactive oxygen species generation systems in rat epididimal spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.65, p,1102-1113, 2001.

VILLEGAS, J.; KEHR, K.; SOTO, L.; HENKEL, R.; MISKA, W.; SÁNCHEZ,R. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. **Andrologia**, v.35, p.227-232, 2003.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v.78, n.6, p. 1272-1277, 2002.

WATSON, P.F.; MARTIN, I.C.A. Regions of the freezing curve causing changes in structure and viability of ram sperm. **Nature**, v.251, p. 315-316, 1974.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, E.J.; CLARK, A. **The effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981. p. 189-218.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessement 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.

WINDSOR, D.P.; WHITE, I.G. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. **Animal Reproduction Science,** v.40, p.43-58, 1995.

WINDSOR, D.P. Mitochondrial function and ram sperm fertility. **Reproduction Fertility and Development**, v.9, p.279-284, 1997.

WU, T-W.; HASHIMOTO, N.; WU, J.; CAREY, D.; LI, R-K., MICKLE, D.A.G.; WEISEL,R.D. The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. **Biochemical Cell Biology**, v.68, p. 1189-1194, 1990.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, Ltd., 1994. v.1, p.189-317.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, v.55, n.6, p. 922-926, 2000.

9- ANEXOS

ANEXO 1 - COMPOSIÇÃO DOS DILUENTES UTILIZADOS

A) TRIS-GLICOSE-GEMA

Meio I		Meio II	
Tris	3,634g	Tris	3,634g
Glicose	0,50g	Glicose	0,50g
Ácido cítrico	1,990g	Ácido cítrico	1,990g
Gema de ovo	15mL	Gema de ovo	15mL
Penicilina Potássica	100.000UI	Glicerol	10mL
Estreptomicina	0,100g	Penicilina Potássica	100.000UI
Água destilada qsp	100mL	Estreptomicina	0,100g
		Água destilada qsp	100mL

Fonte: Salamon & Maxwell (2000)

B) TRIS-GLICOSE-GEMA COM 0,5 OU 1,0% OEP

Meio I		Meio II	
Tris	3,028g	Tris	3,028g
Glicose	0,20g	Glicose	0,20g
Ácido cítrico	1,675g	Ácido cítrico	1,675g
Água destilada	80mL	Água destilada	66mL
Gema de ovo	20mL	Gema de ovo	20mL
OEP	0,5 ou 1%	Glicerol	14mL
Penicilina Potássica	100.000UI	OEP	0,5 ou 1%
Estreptomicina	0,100g	Penicilina Potássica	100.000UI
		Estreptomicina	0,100g
TOTAL	*100mL*		*100mL*

Fonte: El-Alamy & Foote (2001)

TRIS: Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 99.9+%, ALDRICH (15,456-3)

Glicose: D (+) GLUCOSE, Anhydrous, SIGMA (G-6152)

Acido cítrico: acido cítrico monohidratado, VETEC (Cód. 237)

C) GLICINA-GEMA-LEITE

LEITE DESNATADO A 11%

Leite em pó desnatado..... 3,30g

Água destilada..... 30,00mL

SOLUÇÃO A

Glicina ---------- 1,40g

Citrato de sódio ----------2,97g

Água destilada ----------100,00mL

SOLUÇÃO B

Frutose ----------3,00g

Água destilada ----------100,00mL

SOLUÇÃO A + B

Solução A ---------- 100,00 mL

Solução B ---------- 100,00 mL

Penicilina Potássica ---------100.000 UI

Dihidroestreptomicina ---------0,100g

COMPOSIÇÃO FINAL

Meio I		**Meio II**	
Solução A+B	60mL	Solução A+B	54,00mL
Gema de ovo	20mL	Gema de ovo	20mL
OEP	0,40mL	OEP	0,40mL
Leite desnatado (11%)	15mL	Leite desnatado (11%)	15mL
Água destilada	4,60mL	Glicerol	10mL
TOTAL	*100mL*		*99,40mL*

ANEXO 2- RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIANCIA – EXPERIMENTO 1

Anexo 2.1- Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação computadorizada da motilidade espermática do sêmen ovino congelado, tendo como fontes de variação os tratamentos (SF, GGL, TRIS; TRIS 0,5 e TRIS 1) e os carneiros. Experimento 1.

Parâmetro	Fonte de Variação	GL	Quadrado médio	F	Valor de p
MT (%)	Blocos (carneiros)	9	237,083	2,594	0,0203
	Tratamento	4	6272,267	68,628	0,0000
	Resíduo	36	91,395		
MP (%)	Blocos (carneiros)	9	173,589	3,873	0,0017
	Tratamento	4	1734,630	38,706	0,0000
	Resíduo	36	44,816		
VAP (µm/s)	Blocos (carneiros)	9	385,428	3,311	0,0049
	Tratamento	4	2863,820	24,602	0,0000
	Resíduo	36	116,391		
VCL (µm/s)	Blocos (carneiros)	9	1091,348	2,515	0,0239
	Tratamento	4	15802,116	36,416	0,0000
	Resíduo	36	443,938		
VSL (µm/s)	Blocos (carneiros)	9	314,234	3,747	0,0021
	Tratamento	4	940,881	11,220	0,0000
	Resíduo	36	83,860		
ALH (µm)	Blocos (carneiros)	9	0,799	1,374	0,2360
	Tratamento	4	23,247	39,971	0,0000
	Resíduo	36	0,582		
LIN (%)	Blocos (carneiros)	9	7,780	0,821	0,6007
	Tratamento	4	587,630	62,023	0,0000
	Resíduo	36	9,474		
TDM (%)	Blocos (carneiros)	9	352,596	2,926	0,0148
	Tratamento	4	4252,171	35,282	0,0000
	Resíduo	36	120,52		

SF: sêmen fresco; GL-graus de liberdade. MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VAP: velocidade de trajeto; VSL: velocidade progressiva; VCL: velocidade curvilinear; ALH: deslocamento lateral da cabeça; LIN: linearidade. TDM: Taxa degradação da motilidade.

Anexo 2.2 – Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal do sêmen ovino congelado, tendo como fontes de variação os tratamentos (SF, GGL, TRIS; TRIS 0,5 e TRIS 1) e os blocos (carneiros). Experimento 1.

Parâmetro	Fonte de Variação	GL	Quadrado médio	F	Valor de p
ACROS (%)	Blocos	9	94,24	4,82	0,000
	Tratamento	4	11,76	0,60	0,619
	Resíduo	36	19,56		
IM1 (%)	Blocos	9	175,819	1,682	0,1057
	Tratamento	4	9549,740	91,365	0,0000
	Resíduo	36	104,533		
IM2 (%)	Blocos	9	169,643	2,989	0,0038
	Tratamento	4	1979,760	34,887	0,0000
	Resíduo	36	56,748		
IM3 (%)	Blocos	9	262,644	2,277	0,0243
	Tratamento	4	3935,525	34,120	0,0000
	Resíduo	36	115,344		

ACROS: acrossomos intactos em microscopia de contraste de fase; IM1: membrana plasmática e acrossomal intactas; IM2: membrana plasmática danificada e membrana acrossomal intacta; IM3: membrana plasmática e acrossomal danificada.

Anexo 2.3- Resumo da análise de variância dos parâmetros da capacitação espermática do sêmen ovino congelado, tendo como fontes de variação os meios diluidores (GGL, TRIS; TRIS 0,5 e TRIS 1) e os carneiros. Experimento 1.

Parâmetro	Fonte de Variação	GL	Quadrado médio	F	Valor de p
F (%)	Blocos (carneiros)	5	290,6	2,941	0,0239
	Tratamento (diluidores)	3	789,00	7,986	0,0003
	Resíduo	39	98,795		
B (%)	Blocos (carneiros)	5	590,933	6,157	0,0003
	Tratamento (diluidores)	3	1112,222	11,588	0,0000
	Resíduo	39	95,983		
AR (%)	Blocos (carneiros)	5	61,683	4,375	0,0029
	Tratamento (diluidores)	3	74,528	5,285	0,0037
	Resíduo	39	14,100		

F: não capacitado; B: capacitado com acrossomo intacto; AR: capacitado com acrossomo reagido.

ANEXO 3- ENSAIO DA LIPOPEROXIDAÇÃO PELO MÉTODO TBA

REAGENTES:

Ácido Tricloroacético: (Trichloroacetic acid AR) Mallinc Krodt Baker , 2928-08

Ácido Tiobarbitúrico: (2-Thiobarbituric acid) FLUKA, 88481

HCl: (Hydrochloric acid) JT Baker, 9535-02

BHT: (Butylated hydroxytoluene) ALDRICH, A-06107TC

Sulfato ferroso: Iron (II) Sufate heptahydrate (FeO_4S-$7H_2O$), FLUKA, 44970

MDA: 1,1,3,3-tetrametoxopropano (Malonaldehyde bis (dimetil acetal), ALDRICH – 10,838-3

REAGENTE TBA

Ácido Tricloroacético 15%

Ácido Tiobarbitúrico 0,375%

HCl 0,25M

Reagentes	Para 1L solução	Para 100mL solução
Ácido Tricloroacético	150g	15g
Ácido Tiobarbitúrico	3,75g	0,375g
HCl	9,115mL	0,9115mL
Agua destilada qsp	1000mL	100mL

Dissolver o ácido Tricloroacético em água, depois acrescentar o ácido Tiobarbitúrico e HCl e completar para o volume desejado. A água pode ser aquecida para ajudar a dissolver o ácido tiobarbitúrico. Dividir em pequenas quantidades e congelar.

SOLUÇÃO DE HIDROXITOLUENO BUTILADO (BHT) 50 mM

BHT ..... 1,102g 0,1102g

Etanol ..... 100mL 10mL

Adicionar 1% (v/v) à solução de TBA ou ao tudo de ensaio com a amostra a ser analisada (0,03mL). Para cada 100ml Reagente TBA acrescentar 1mL da solução de BHT.

SOLUÇÃO DE $FeSO_4$ 2,4 mM

$FeSO_4$..... 0,013344g

H_2O destilada..... 20mL

Adicionar 100µL para 1mL de amostra, concentração final 0,24mmol. Guardar em geladeira e utilizar por, no máximo, cinco dias.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE MALONALDEIDO A 10mM

Malonaldehyde bis (dimethyl acetal) (1,1,3,3-tetrametoxopropano)

Solução comercial MDA ..... 166µL 17µL

Solução HCl 2N ..... 100mL ..... 10 mL

Preparar diariamente, antes de iniciar o ensaio.

Solução HCl 2N (100mL)

HCl .....…….. 24,3mL

H_2O destilada ..... 75,7 mL

ANEXO 4- ENSAIO DO ÂNION SUPERÓXIDO

REAGENTES:

EDTA (Ácid ethylenediaminetetraacetic, pm 292,24): SIGMA-ALDRICH, E9884.

NBT (Nitrotetrazolium Blue Chloride, pm 817,65): FLUKA Biochemika, 74030

HYPOXANTHINE (pm 136,11): FLUKA Chemika -56700

XANTINA OXIDASE (suspensão c/ 50U/4,7mL): SIGMA-ALDRICH, X-1875

Concentrações Finais no Meio Reacional

NBT-100 µM, EDTA- 1mM, Hipoxantina -100µM, Xantina Oxidase - 0,0666U.

EDTA 10mM ----------	100µL	70µL
NBT 1mM ----------	100µL	70µL
Hipoxantina 10mM ----------	10µL	7 µL
Xantina Oxidase (0,0666U) em Tampão Tris (pH 7,4) ----	100µL	70 µL
VOLUME FINAL MEIO REACIONAL	**1000u**L	**700**mL

Solução Estoque EDTA 10 mM

EDTA .....0,002922g ---------- 0,02922g

Tampão Tris ..... 1,0mL ---------- 10 mL

Pegar 100µL e adicionar a cubeta com a amostra. Estável a 4°C por 3dias.

Solução Estoque Hipoxantina 10mM

Hipoxantina ---------- 0,001361g ---------- 0,01361g

KOH 50mM ..... 1mL ---------- 10mL

Diluir diariamente, antes do uso. Pegar 10µL e adicionar a cubeta com a amostra.

Solução KOH 50mM

KOH ---------- 0,0028055g ---------- 0,02805g

H_2O qsp ---------- 1mL ----------10mL

Solução Estoque NBT 1mM

NBT ---------- 0,0008176g --------- 0,008176g

Tampão Tris (pH 7,4) ..... 1mL ---------- 10 mL

Guardar em geladeira, frasco absolutamente protegido da luz, estável por uma semana. Pegar 100µL e adicionar a cubeta com a amostra.

XANTINA OXIDASE

XO (suspensão) ---------- 6,20µL ------ 4,38µL

Tampão Tris (pH 7,4) ---------- 93,8 µL ------ 65,63 µL

TOTAL **100mL** **70mL**

Manter a XO na geladeira, no momento do uso colocar sobre gelo reciclável. Diluir imediatamente antes do uso. Injetar após o START. Secar a ponteira antes de injetar.

A reação é iniciada pela adição da xantina oxidase

TAMPÃO TRIS pH 7,4

Tris ---------- 1,8184g

Ácido cítrico ($1H_2O$) ---------- 0,9901g

H_2O destilada qsp ---------- 50mL

ANEXO 5- ENSAIO DO PEROXIDO DE HIDROGÊNIO

REAGENTES:

NaCl: JT-Baker, 3624-19

Fosfato de potássio: (Potassium Phosphate, monobasic, anhydrous) Amresco

Glicose: (D+ Glucose Anhydrous) SIGMA, G-6152

Phenol Red: (Phenol Red) SIGMA, P3532

Peroxidase: (Peroxidase from horse radish, 113U/mg) FLUKA, Biochemika 77330.

H_2O_2: (Perhydrol 30% H_2O_2 PA) Merck, 7209.1000

Solução de Phenol Red (PRS)

NaCl 140mM (0,818g/100mL)

Fosfato de potássio (pH 7.0)..... 10mM (0,1361g/100mL

Dextrose (glicose) .....……..... 5,5mM (0,099g/100mL)

Phenol Red 0,28mM (0.1g/L)

Peroxidase (HRPO) ..... 8.5 U/Ml (50µg/mL)

Acrescentar o fenol red e HRPO imediatamente antes da realização do ensaio.

Solução Estoque Phenol Red 10g/L (10mg/mL)

Phenol Red 0,01g

H_20 destilada ..... 1 mL

Pegar 10µL e adicionar a 1Ml do tampão phenol red (PRS), concentração final **0,1g/L**. Armazenar a 4°C em mini-tubos envoltos em papel alumínio.

Solução Estoque Peroxidase 0,5mg/mL

Horse radish peroxidase 1mg

Tampão Tris ou tampão fosfato (Ph 7,0) 2mL

Pegar 100µL e adicionar a 1mL do tampão phenol red (PRS), concentração final 0,05mg/mL ou **50mg/mL**. Armazenar a –20°C em pequenas alíquotas, suficientes para um único ensaio.

Solução Estoque H_2O_2 10 mM

1- Diluir 1,02mL de H_2O_2 30% em 1000mL de água destilada (ultrapura); (ou 102µL em 100mL)
2- Resulta em uma concentração 0,01M
3- Determinar concentração real da solução, medindo absorbância a 230nm; usando o coeficiente de absorção molar 81 M^{-1} cm^{-1}
4- Guardar em geladeira em frasco de vidro coberto com papel alumínio ou vidro âmbar até a utilização.

ANEXO 6 - RESUMOS DAS ANÁLISES DE VARIÂNCIA – EXPERIMENTO 2

Anexo 6.1 Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA): motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), freqüência de batimentos do flagelo (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), elongação (ELONG); espermatozóides rápidos (RAP) e estáticos (STATIC) no sêmen ovino congelado, tendo como causas de variação os tratamentos (diluidores: TRIS; TRO+, CAT+ e TRO/CAT +) e os blocos (carneiros). Experimento 2.

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de p
MT (%)	Blocos	22	2832,790	25,934	0,0000
	Tratamento	3	1034,610	9,472	0,0000
	Resíduo	158	109,229		
MP (%)	Blocos	22	868,316	15,040	0,0000
	Tratamento	3	214,920	3,723	0,0127
	Resíduo	158	57,733		
VAP (mm/s)	Blocos	22	1216,419	18,101	0,0000
	Tratamento	3	191,997	2,857	0,0389
	Resíduo	158	67,201		
VCL (mm/s)	Blocos	22	2757,969	22,623	0,0000
	Tratamento	3	801,317	6,573	0,0003
	Resíduo	158	121,912		
VSL (mm/s)	Blocos	22	735,541	12,355	0,0000
	Tratamento	3	80,038	1,344	0,2620
	Resíduo	158	59,536		
ALH (mm)	Blocos	22	1,765	6,980	0,0000
	Tratamento	3	0,708	2,798	0,0420
	Resíduo	158	0,253		

Anexo 6.1 Continuação

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
BCF (Hz)	Blocos	22	26,956	4,835	0,0000
	Tratamento	3	5,196	0,932	0,4268
	Resíduo	158	5,575		
STR (%)	Blocos	22	28,385	3,346	0,0000
	Tratamento	3	41,645	4,908	0,0027
	Resíduo	158	8,485		
LIN (%)	Blocos	22	50,625	5,148	0,0000
	Tratamento	3	41,420	4,212	0,0067
	Resíduo	158	9,834		
ELON (%)	Blocos	22	58,079	3,289	0,0000
	Tratamento	3	212,254	12,021	0,0000
	Resíduo	158	17,657		
RAP (%)	Blocos	22	2705,996	25,724	0,0000
	Tratamento	3	681,239	6,476	0,0004
	Resíduo	158	105,195		
STATIC (%)	Blocos	22	2412,529	22,108	0,0000
	Tratamento	3	952,638	8,730	0,0000
	Resíduo	158	109,127		

TRIS: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP; TRO+: diluidor TRIS aditivado com Trolox, CAT+: diluidor TRIS aditivado com catalase, TRO/CAT+: diluidor TRIS + Trolox e catalase.

Anexo 6.2- Resumo da análise de variância dos parâmetros da analise de integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal e potencial de membrana mitocondrial pelo método de fluorescência (FITC/PSA, IP, JC-1) e microscopia de contraste de fase, do sêmen ovino congelado, tendo como causas de variação os tratamentos (diluidores TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT +) e os blocos (carneiros), Experimento 2.

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de p
F1 (%)	Bloco	22	3,711	3,663	0,0000
	Tratamento	3	6,804	6,716	0,0003
	Resíduo	158	1,013		
F2 (%)	Bloco	22	1139,340	15,095	0,0000
	Tratamento	3	399,391	5,291	0,0017
	Resíduo	158	75,480		
F5 (%)	Blocos	22	1,984	3,219	0,0000
	Tratamento	3	1,536	2,492	0,0621
	Resíduo	158	0,616		
F6 (%)	Blocos	22	281,947	8,522	0,0000
	Tratamento	3	104,522	3,159	0,0263
	Resíduo	158	33,085		
F7(%)	Blocos	22	1,634	1,867	0,0151
	Tratamento	3	1,565	1,788	0,1516
	Resíduo	158	0,875		
F8 (%)	Blocos	22	1201,951	12,414	0,0000
	Tratamento	3	449,065	4,638	0,0039
	Resíduo	158	96,825		

Anexo 6.2- Continuação

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
PSA+ (%)	Blocos	22	1196,352	12,201	0,0000
	Tratamento	3	502,630	5,126	0,0021
	Resíduo	158	98,054		
MPAI (%)	Blocos	22	1233,919	14,758	0,0000
	Tratamento	3	296,949	3,552	0,0159
	Resíduo	158	83,612		
BPM (%)	Blocos	22	13,492	3,737	0,0000
	Tratamento	3	10,841	3,002	0,0323
	Resíduo	158	3,616	3,737	0,0000
APM (%)	Blocos	22	13,492	3,002	0,0323
	Tratamento	3	10,841		
	Resíduo	158	3,616		
ACRO (%)	Blocos	22	349,151	14,413	0,0000
	Tratamento	3	41,333	1,706	0,1681
	Resíduo	158	24,225		

TRIS: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP; TRO+: diluidor TRIS aditivado com Trolox, CAT+: diluidor TRIS aditivado com catalase, TRO/CAT+: diluidor TRIS + Trolox e catalase. F1: membrana plasmática e acrossomal intacta, com alto potencial de membrana mitocondrial; F2: membrana plasmática e acrossomal intacta, com baixo potencial de membrana mitocondrial; F5: membrana plasmática danificada, membrana acrossomal intacta, com alto potencial de membrana mitocondrial; F6: membrana plasmática danificada, membrana acrossomal intacta, com baixo potencial de membrana mitocondrial; F7: membrana plasmática e acrossomal lesada, com alto potencial de membrana mitocondrial; F8: membrana plasmática e acrossomal lesada, com baixo potencial de membrana mitocondrial; PSA+ : células com acrossomo corado pelo FITC-PSA; MPAI: células com membrana plasmática e acrossomal intactas; BPM: células com baixo potencial de membrana mitocondrial; APM: células com alto potencial de membrana mitocondrial; ACRO: acrossomo íntegro pela microscopia de contraste de fase.

Anexo 6.3- Resumo da análise de variância da geração de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e lipoperoxidação (TBARS) no sêmen ovino congelado, na presença ou não de um catalisador químico da geração de cada ROS ($FeSO_4$, HXO e H_2O_2-E) tendo como causas de variação os tratamentos (diluidores: TRIS, TRO+, CAT+ e TRO/CAT +) e os blocos (carneiros), Experimento 2.

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
TBARS (Sêmen)	Blocos	22	0,2361	7,370	0,0000
	Tratamento	3	0,0329	1,029	0,3816
	Resíduo	158	0,0320		
TBARS (+$FeSO_4$)	Blocos	22	0,4873	8,011	0,0000
	Tratamento	3	1,6417	26,990	0,0000
	Resíduo	158	0,061		
O_2^- (Sêmen)	Blocos	22	0,552	4,473	0,0000
	Tratamento	3	0,572	4,638	0,0039
	Resíduo	158	0,123		
O_2^- (+HXO)	Blocos	22	0,463	2,661	0,0002
	Tratamento	3	0,298	1,716	0,1660
	Resíduo	158	0,174		
H_2O_2 (Sêmen)	Blocos	22	21,335	14,862	0,0000
	Tratamento	3	9,148	6,373	0,0004
	Resíduo	158	1,435		
H_2O_2 (+H_2O_2-E)	Blocos	22	0,731	3,478	0,0000
	Tratamento	3	38,753	184,469	0,0000
	Resíduo	158	0,210		

TRIS: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP; TRO+: diluidor TRIS aditivado com Trolox, CAT+: diluidor TRIS aditivado com catalase, TRO/CAT+: diluidor TRIS + Trolox e catalase. $FeSO_4$: sulfato ferroso; HXO: sistema gerador de O_2^- hipoxantina-xantina oxidase; H_2O_2-E: peróxido de hidrogênio exógeno; TBARS: substancias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Anexo 6.4- Resumo da análise de variância da geração de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e lipoperoxidação (TBARS) no diluidor, na presença ou não de um catalisador químico da geração de cada ROS ($FeSO_4$, HXO e H_2O_2-E) tendo como causas de variação os tratamentos (TRIS; TRO+, CAT+ e TRO/CAT +), Experimento 2.

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de p
TBARS (na amostra)	Tratamento	3	0,0266	0,538	0,6616
	Resíduo	20	0,0494		
TBARS (+$FeSO_4$)	Tratamento	3	12,2691	184,171	0,0000
	Resíduo	20	0,0666		
O_2^- (na amostra)	Tratamento	3	0,0277	3,003	0,0547
	Resíduo	20	0,0092		
O_2^- (+HXO)	Tratamento	3	1,0373	2,134	0,1279
	Resíduo	20	0,4861		
H_2O_2 (na amostra)	Tratamento	3	2,8871	3,657	0,0299
	Resíduo	20	0,7894		
H_2O_2 (+H_2O_2-E)	Tratamento	3	78,7406	20,164	0,0000
	Resíduo	20	3,9049		

TRIS: diluidor Tris-glicose-gema com 1% de OEP; TRO+: diluidor TRIS aditivado com Trolox, CAT+: diluidor TRIS aditivado com catalase, TRO/CAT+: diluidor TRIS + Trolox e catalase. $FeSO_4$: sulfato ferroso; HXO: sistema gerador de O_2^- hipoxantina-xantina oxidase; H_2O_2-E: peróxido de hidrogênio exógeno; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.