UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VIABILIDADE E CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICAS, GERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2) E LIPOPEROXIDAÇÃO NO SÊMEN OVINO ADICIONADO DE PLASMA SEMINAL OU ANTIOXIDANTES APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO

CARMEN CECILIA SICHERLE

Botucatu – SP
Dezembro 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VIABILIDADE E CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICAS, GERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2) E LIPOPEROXIDAÇÃO NO SÊMEN OVINO ADICIONADO DE PLASMA SEMINAL OU ANTIOXIDANTES APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO

CARMEN CECILIA SICHERLE

Dissertação apresentada junto ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para a obtenção do título de Mestre em Reprodução Animal

Orientador: Prof. Adj. Sony Dimas Bicudo

Botucatu – SP
Dezembro 2007

Meu filho Antonio,
No meio de tudo isso veio você, que esperei por tanto tempo...
Meu amor, cada dia que passa gosto mais de você.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família:

- Ao meu marido Kiko que me incentivou em todos os momentos e me ajudou muito, sempre do meu lado.

- Ao meu pai Carlos por me mostrar a importância em adquirir conhecimento, pela amizade, por ter me apoiado na criação de ovinos e por estar sempre ao meu lado.

- A minha mãe Maria Emilia pela força e por todos os momentos vividos até hoje.

AGRADECIMENTOS

- Ao prezado Professor e Orientador Sony Dimas Bicudo, obrigada por me aceitar, orientar e acompanhar neste trabalho.

- A minha querida amiga Marciane Maia, obrigada pela ajuda, pela técnica, enfim pela amizade.

- Aos colegas e amigos Marciane Maia, Renata Green, Leandro Rodello, Hymerson Costa e Daniel Bártoli, pelas ótimas, divertidas, estressadas, engraçadas e proveitosas horas de trabalho.

- Ao departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pela disponibilização das suas instalações e equipamentos.

- Aos professores e funcionários do departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES X
LISTA DE TABELAS XI
RESUMO XIV
ABSTRACT.....XV

1. **INTRODUÇÃO 1**
2. REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 Plasma Seminal 3
2.1.1Proteínas do Plasma Seminal 5
2.2 Espécies Reativas do Oxigênio (ROS) 7
2.2.1Radical superóxido (O_2^-) 8
2.2.2Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 8
2.2.3Radical hidroxila (OH°) 9
2.2.4Óxido nítrico (NO) 9
2.3 Sistemas Antioxidantes 10
2.3.1 Catalase ……..10
2.3.2 α - Tocoferol (vitamina E) 11
2.3.3 Trolox C (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico) 11
2.4 Sistemas Oxidantes/ antioxidantes e a Função Espermática.....12
2.4.1 Produção e Degradação das ROS no Sêmen.....12
2.4.2 ROS e Capacitação Espermática.....16
2.4.3 Interações das ROS com os Espermatozóides.....17
a) Lipoperoxidação.....17

2.5 Efeitos da Adição de Plasma Seminal e Antioxidantes na Viabilidade Espermática.....19
2.6 Criopreservação do Sêmen.....24
2.6.1 Meio Diluidor.....26
2.6.2 Avaliação das Membranas Espermáticas.....27
3. HIPÓTESE.....30
4. OBJETIVOS.....30
5. MATERIAL E MÉTODOS.....31
5.1 Local.....31
5.2 Animais Experimentais.....31
5.3 Procedimentos Experimentais.....31
5.3.2 Diluição do sêmen.....32
5.3.3 Congelação do sêmen.....32
5.3.4 Descongelação das amostras.....33
5.3.5 Avaliação computadorizada da cinética espermática.....34
5.3.6 Avaliação da integridade de membrana.....35
5.3.7 Capacitação espermática e reação acrossomal.....38
5.3.8 Quantificação da lipoperoxidação.....38
5.3.9 Quantificação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....40
5.4 Análise Estatística.....43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....44
6.1 Avaliação Computadorizada da Cinética Espermática.....44
6.2 Integridade de Membrana.....49
6.3 Capacitação Espermática.....51
6.4 Lipoperoxidação e Geração de H_2O_2 53
7. CONCLUSÕES 59
8. REFERÊNCIAS.....60
9. ANEXO 1.....67
9.1 Composição do Meio Diluente Gilcina Gema Leite.....67
9.2 Solução de PBS 68
9.3 Soluções para avaliação da integridade de membrana 68

9.4 Soluções para o teste de capacitação pela Clortetraciclina.....69

9.5 Ensaio da lipoperoxidação pelo método TBA 70

9.6 **Ensaio do peróxido de hidrogênio 71**

9.7Setup 12.3 Hamilton Thorne Biosciences – IVOS 12.3 ……..72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
µm	micrômetro
ALH	amplitude de deslocamento lateral da cabeça
ANOVA	análise variância
AR	espermatozóides capacitados com acrossomo reagido
B	espermatozóides capacitados com acrossomo intacto
BCF	freqüência de batimentos do flagelo
BHT	hidroxitolueno butilatado
CASA	sistema computadorizado de avaliação da motilidade espermática
CAT	catalase
CO	grupo experimental controle
CTC	clortetraciclina
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DIC	diacetato de carboxifluoresceína
DMSO	dimetilsulfóxido
F	espermatozóides não capacitados
FITC/PSA	Aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína
g	grama
GGL	diluidor Glicina-gema-leite
GPx	glutationa Peroxidase
GR	glutationa Redutase
GSH	glutationa
IA	inseminação artificial
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
MP	motilidade Progressiva
MT	motilidade Total
NADPH	nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato
PBS	solução tamponada salina
RAP	rápidos
ROS	metabólitos Reativas do Oxigênio
SOD	superóxido dismutase
STATIC	espermatozóides imóveis
STR	retilinearidade
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias Reativas ao Ácido tiobarbitúrico
VAP	velocidade de trajeto
VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade progressiva

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Reação formadora de radicais a partir do O_2.....8
Figura 2. Esquema de visualização e interpretação das categorias para análise da integridade de membrana.....36
Figura 3. Esquema das características visuais e de interpretação das categorias espermáticas observadas na avaliação da capacitação pelo CTC.....37
Figura 4: painel de fotos do processo de análise de TBARS e de geração de H_2O_2.....42
Figura 5. Visualização dos padrões da análise da capacitação –CTC.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA) no sêmen ovino congelado/descongelado frente aos tratamentos CAT (catalase), CO (controle), PS (plasma seminal) e TRO (trolox).....45

Tabela 2 - Médias ± erro padrão dos parâmetros de cinética espermática, pelo sistema de análise computadorizada (CASA) no sêmen ovino congelado/descongelado frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox).....46

Tabela 3 - Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal pelo método de fluorescência (IP e DIC) no sêmen ovino congelado/descongelado frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox) – IM1: membrana plasmática e acrossomal íntegras; IM2: membrana plasmática danificada e membrana acrossomal íntegra; IM3 membranas plasmática e acrossomal danificadas.....49

Tabela 4 - Médias ± erro padrão dos parâmetros de integridade de membrana plasmática e acrossomal pelo método de fluorescência (IP e DIC) no sêmen ovino congelado/descongelado frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox).....49

Tabela 5 - Resumo da análise de variância dos parâmetros de capacitação espermática (CTC), no sêmen ovino frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox), tendo como variação os blocos e os tratamentos.....52

Tabela 6 - Médias ± erro padrão dos parâmetros de capacitação espermática pelo método de fluorescência através do CTC: padrão F: espermatozóides não capacitados; padrão B: alterações semelhantes a capacitação; padrão AR: espermatozóides com acrossomo reagido, no sêmen ovino frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox).....53

Tabela 7 - Resumo da análise de variância dos parâmetros da geração de peróxido de hidrogênio H_2O_2 e lipoperoxidação (TBARS) no sêmen ovino, na presença ou não de um catalisador químico da geração de H_2O_2 e da lipoperoxidação, tendo como causa de variação os tratamentos (catalase, controle, plasma seminal e trolox) e os blocos (carneiros).....55

Tabela 8 - Médias ± erro padrão das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), geradas no sêmen ovino durante a lipoperoxidação espontânea (LE) ou catalisada por 0,24 mmol de $FeSO_4$-$7H_2O$ (LC) frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox).....56

Tabela 9 - Médias ± erro padrão das concentrações de peróxido de hidrogênio gerado no sêmen ovino e no sêmen ovino na presença de H_2O_2 exógeno (100 nmol/mL) adicionado ao meio reacional,frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox).....57

Tabela 10 - Médias ± erro padrão das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) geradas no meio diluidor e no plasma seminal em PBS durante a lipoperoxidação espontânea (LE) ou catalisada por 0,24 mmol de $FeSO_4$-$7H_2O$ (LC) e das concentrações de peróxido de hidrogênio gerados no meio diluidor e no plasma seminal em PBS e destes na presença de H_2O_2 exógeno (100 nmol/mL).....57

“A Medicina é uma ciência de verdades transitórias”

Jô Soares

RESUMO

SICHERLE, C.C. **Viabilidade e capacitação espermáticas, geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e lipoperoxidação no sêmen ovino adicionado de plasma seminal ou antioxidantes após a criopreservação**. Botucatu, 2007. 73p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"– UNESP.

Objetivou-se avaliar a adição de plasma seminal e dos antioxidantes, catalase e Trolox, ao sêmen ovino após sua congelação e descongelação. Constituíram–se quatro grupos, **CO** (controle - com adição de 200µL PBS), **CAT** (catalase - 12,5 mg/mL = 8 µL + 162 µL PBS), **TRO** (Trolox - 100 µMol/ 100 x 10^6 sptz = 3,4 µL + 166,6 µL PBS), **PS** (60% de plasma seminal em PBS = 200 µL) em que os aditivos foram acrescidos (v/v) na proporção de 1:1, às amostras de sêmen criopreservado de 13 carneiros. Os parâmetros de cinética espermática determinados através da análise computadorizada (CASA), a integridade de membrana avaliada pela combinação das sondas fluorescentes Iodeto de Propídeo e Diacetato de Carboxifluoresceína, bem como a capacitação espermática constatada pelo ensaio da Clortetraciclina não foram influenciados pelo tratamento (P>0,05). A adição de plasma seminal teve um efeito deletério sobre a lipoperoxidação avaliada pela produção de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), e geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelo método do *Phenol Red* de H_2O_2. O Trolox foi efetivo em controlar a produção de TBARS nos sistema geradores (adição de $+FeSO_4$). Uma vez que a adição de antioxidantes foi benéfica, por prevenir a formação adicional de TBARS e geração de H_2O_2 no sistema gerador, sua utilização em sêmen ovino após a criopreservação pode ser indicada, principalmente em situações de maior desafio oxidativo.

Palavras-chave: ROS, antioxidantes, plasma seminal, espermatozóide, ovinos, criopreservação.

ABSTRACT

SICHERLE, C.C. **Viabilidade e capacitação espermáticas, geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e lipoperoxidação no sêmen ovino adicionado de plasma seminal ou antioxidantes após a criopreservação**. Botucatu, 2007. 73p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"– UNESP.

The aim of this study was to evaluate the addition of the antioxidants, catalase e Trolox, and the seminal plasma in frozen thawed ram semen. Four groups was established, **CO** (control 200 µL PBS), **CAT** (catalase - 12,5 mg/mL = 8 µL + 162 µL PBS), **TRO** (Trolox - 100 µMol/ 100 x 10^6 sptz = 3,4 µL + 166,6 µL PBS), **PS** (60% of seminal plasma in PBS = 200 µL) added in the proportion of 1:1 (v/v) in cryopreserved semen of 13 rams.The spermatozoa kinematics was determined by CASA, the membrane integrity was determined by the combination of the fluorescent probes Propidium Iodide and Carboxyfluorescein, and the capacitation status was assessed by Chlortetracycline assay. No statistic difference were found for these parameters (P>0,05).The addition of seminal plasma was deleterious on lipid peroxidation analysed by the production of TBARS (thiobarbituric acid reactive species) and on the generation of hydrogen peroxide (H_2O_2) assessed by Phenol Red assay. An effective effect was found in the production of TBARS in the addition of Trolox in the generation system (addition of +$FeSO_4$). Once the addition of antioxidants were beneficial in prevent de additional generation of TBARS and H_2O_2 in the generator system, they can be use after the cryopreservation of ram semen, especially in case of oxidative stress.

Keywords: ROS, antioxidants, seminal plasma, spermatozoa, ram, cryopreservation.

1. INTRODUÇÃO

O princípio dos estudos sobre inseminação artificial (IA) em ovinos data do início do século vinte, onde as investigações sobre meios de diluição e reprodução levaram ao desenvolvimento e a aplicação prática da IA em animais de produção (SALAMON & MAXWELL, 2000).

A necessidade da utilização do sêmen de machos não presentes na mesma propriedade de criação de ovelhas durante diferentes épocas do ano, estimulou a pesquisa sobre a armazenagem do espermatozóide sobre condições artificiais. Isso pôde ser alcançado através da redução no metabolismo do espermatozóide prolongando sua vida fértil (SALAMON & MAXWELL, 2000).

A capacitação, que tem início quando o sêmen deixa o epidídimo, não deve estar completa até o momento da ovulação, pois uma vez capacitado o tempo de vida do espermatozóide é curto.

Após a congelação e descongelação do sêmen ovino, a maior parte dos espermatozóides encontram-se capacitados. Desta forma a técnica utilizada para inseminação artificial (IA) é determinante para a garantia de resultados satisfatórios. Nesta espécie, até o momento, os melhores índices de prenhez são obtidos pela deposição do sêmen no local e no momento mais próximo a ovulação através da utilização de laparoscópio (SALAMON & MAXWELL, 1995; GILLAN et al., 1997). Todavia, o aumento do número de animais e do maior consumo da carne ovina faz com que o interesse pelo desenvolvimento tecnológico seja crescente principalmente na preservação do sêmen a longo prazo para uso na inseminação artificial cervical que seria mais prática e econômica do que a laparoscopia. Porém os baixos índices de gestação obtidos pela IA cervical ou trans-cervical com sêmen congelado limitam a aplicação destas técnicas nesta espécie e mostra a necessidade de mais estudos sobre as técnicas de IA bem como na preservação do espermatozóide congelado e descongelado.

A manipulação do sêmen e o processo de congelação e descongelação levam a mudanças estruturais e bioquímicas da célula espermática, mudanças estas que aconteceriam naturalmente, porém em um período de tempo maior o que permitiria sua sobrevivência até o momento da fertilização. Dentre

outras alterações o estresse oxidativo leva a geração excessiva de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS) acelerando o processo de capacitação e conseqüente morte celular.

Os efeitos causados pela geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) na reprodução masculina tem sido alvo das pesquisas. Níveis excessivos de ROS no sêmen são inversamente proporcionais a motilidade espermática. Ao mesmo tempo, a geração das ROS é necessária para o desencadeamento da capacitação espermática (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1999).

Como as ROS são geradas a partir da redução incompleta do oxigênio como parte da cadeia respiratória celular, a célula possui um sistema de defesa antioxidante que pode atuar de duas formas, como inativador dos agentes oxidantes ou como reparador da lesão já ocorrida (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A maior parte dos agentes antioxidantes está presente no meio intracelular. Sendo que a célula espermática também pode contar com os antioxidantes contidos no plasma seminal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plasma Seminal

Fatores como estimular ou inibir a função espermática e a fertilidade tem sido atribuídas ao plasma seminal (PS) a muito tempo. Estes efeitos são mediados por ações multifuncionais de componentes orgânicos e inorgânicos que fazem parte de sua composição como as proteínas e membranas vesiculares (MAXWELL et al., 2006).

Secretado principalmente pela vesícula seminal, pelos testículos, epidídimo, ducto deferente e outras glândulas acessórias sexuais, o plasma seminal é uma mistura composta que difere entre as espécies (EVANS & MAXWELL, 1987).

Basicamente o PS possui três funções básicas: ser um veículo para o espermatozóide, transportando-os durante a ejaculação, servir como um meio "ativador" para os espermatozóides inicialmente não móveis e provir um sistema tampão, um meio rico em nutrientes que ajuda na sobrevivência dos espermatozóides após sua deposição no trato reprodutivo feminino (EVANS & MAXWELL, 1987).

Em carneiros, o PS é um fluido claro e opaco, mas o sêmen pode ser branco e cremoso devido a grande concentração de espermatozóides. Sendo composto em sua maior parte por água, por volta de 75%, contém inúmeros componentes orgânicos e inorgânicos que servem para nutrir e proteger os espermatozóides (EVANS & MAXWELL, 1987).

Geralmente é uma substância isotônica e neutra. Seu pH é mantido em torno de 7.0 pelo sistema tampão que protege os espermatozóides contra mudanças repentinas o que seria deletério a sobrevivência dos espermatozóides.

Ao contrario de outros fluidos corporais, a pressão osmótica do sêmen é mantida mais pelas substâncias orgânicas do que as inorgânicas. Este fato se deve provavelmente a presença de consideráveis quantidades de sódio, potássio e íons cloreto. Os constituintes orgânicos presentes em maior quantidade no plasma seminal de carneiros são: frutose, sorbitol, inositol, ácido clorídrico, glicerilfosforilcolina, fosfolipídios, prostaglandinas e proteínas. A frutose

representa a maior fonte de energia para o espermatozóide (EVANS & MAXWELL, 1987).

Componentes antimicrobianos, como as imunoglobulinas da classe IgA, também estão presentes, bem como uma variedade de substâncias hormonais incluindo andrógenos, estrógenos, prostaglandinas, FSH, LH hormônios do crescimento, insulina, glucacon, prolactina, relaxina, hormônios liberadores da tireóide e encefalinas (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Apesar de serem encontradas no PS de diferentes espécies, as prostaglandinas são encontradas em quantidades particularmente altas no caso de carneiros e bodes. E como são estimulantes da contração da musculatura uterina, acredita-se então que pode funcionar auxiliando no transporte espermático (EVANS & MAXWELL, 1987).

A adição ou remoção de uma variedade de proteínas, presentes no PS, durante a maturação epididimária e na ejaculação tem um papel importante na capacitação do espermatozóide e conseqüente fertilização do oócito (BARRIOS et al., 2000).

Diversas pesquisas sugerem que o plasma seminal contém fatores que podem influenciar a fertilidade de machos de diferentes espécies. Estes estudos geralmente são baseados na composição do plasma seminal entre machos com fertilidade diferentes, ou pelo isolamento de fatores contidos no plasma seminal que facilitam ou inibem a capacitação espermática ou a fertilização (JONES et al., 1979; KILLIAN et al., 1993; JOBIM et al., 2005; CARDOSO et al., 2006; ELHAJJGHAOUI et al., 2006; PESCH et al., 2006).

O PS é composto por diversas substâncias como, macro elementos (entre eles: cálcio, sódio e potássio), lipídeos (principalmente os fosfolipídios, colesterol), micro elementos (zinco, cobre e ferro), prostaglandinas, carboidratos, compostos nitrogenados (colina e poliaminas), proteínas, enzimas e antioxidantes (MAXWELL & JOHNSON, 1999; PESCH et al., 2006).

2.1.1Proteínas do Plasma Seminal

Há evidências de que algumas proteínas do plasma seminal são adsorvidas pela superfície do espermatozóide após a ejaculação (KILLIAN et al., 1993; BARRIOS et al., 2000; JOBIM et al., 2005; MAXWELL et al., 2006).

O PS de bovinos contém uma série de proteínas denominadas BSP A1, A2, A3 e BSP 30 kDa, agrupadas como as proteínas BSPs (proteínas do plasma seminal de bovinos). Estas proteínas aderem ao espermatozóide durante a ejaculação e desempenham papel importante na motilidade, viabilidade e na fertilização (JOBIM et al., 2004).

Em estudo realizado por Killian et al. (1993) demonstrou-se a existência de pelo menos quatro proteínas associadas à fertilidade encontradas no PS de bovinos. Onde as proteínas com 26 kDa e 55 kDa foram encontradas com maior freqüência e densidade nos touros de maior fertilidade enquanto as de 16 kDa (ponto isoelétrico (pI) 4.1 e pI 6.7) mostraram-se mais proeminentes nos touros de baixa fertilidade. Os autores relacionam estas proteínas com as mesmas BSPs, devido a características de ligação ao espermatozóide e seqüências de aminoácidos.

A proteína de 55 kDa (pI 4.5) foi posteriormente identificada como uma osteopontina por Cancel et al. (1997) e a de 26 kDa (pI 6.2) como uma prostaglandina-D (GERENAM et al., 1998).

As propriedades biológicas das proteínas presentes no PS têm sido extensivamente estudadas. Seu papel na fertilização e especificamente na capacitação se deve a sua ligação com o grupo colina de fosfolipídios presentes na membrana espermática, a lipoproteínas de alta densidade (HDL) e glicosaminoglicanos como a heparina (GAGs) presentes nos fluídos folicular e do oviduto (DESNOYERS & MANJUNATH, 1992).

Barrios et al. (2000) identificaram 20 frações de polipeptídios no plasma seminal de carneiros, com pesos molecular variando entre menos de 12 a quase 200 kDa. Sendo que as bandas mais proeminentes foram aquelas menores que 70 kDa. Investigações sobre quais destas proteínas estariam envolvidas na reversão do choque térmico, sofrido pelo espermatozóide durante o experimento por eles desenvolvido, foram testadas com diferentes metodologias. Os autores

concluíram que a lipoproteínas não são responsáveis pela reversão do choque térmico induzido, porque a adição isolada de lipoproteínas não foi capaz de reverter o efeito causado ao espermatozóide.

Em estudo mais recente, Barrios et al. (2005), reconheceram serem duas as proteínas envolvidas neste efeito protetor ao choque térmico, as de aproximadamente 14 kDa (P14) e as de 20 kDa (P20).

Jobim et al. (2005) identificaram 21 frações protéicas, no plasma seminal de carneiros, contendo peso molecular entre 15 e 115 kDa. As frações mais proeminentes foram aquelas menores que 30 kDa sendo intensas as de fração 3 (18 -19 kDa), fração 5 (17 -18 kDa), fração 7 (15 -16 kDa) e fração 23 (105 – 108 kDa). As frações 3 e 5 obtiveram maior intensidade em relação as demais frações e conforme a metodologia utilizada, os resultados sugerem que esta frações seriam as mesmas BSP A1 e BSP A2.

No mesmo experimento outras relações com proteínas anteriormente encontradas em outras espécies são sugeridas. A fração proteica 7 poderia ser a metaloproteinase – 2 inibidora de tecido (TIMP-2), um potente inibidor da matriz-metaloproteinase (MMPs), presente no fluido epididimário de carneiros, bodes e garanhões. As frações 17 (33 – 35 kDa), 23 (105- 108 kDa), 35 (75 – 78 kDa) e 41 (65 – 67 kDa) provavelmente correspondem as MMPs ovinas, por terem massas moleculares e pontos isoelétricos (pI) similares. A fração 9 (21 – 23 kDa) pode ser a prostaglandina D2 (PGDS), a maior secreção protéica epididimária no carneiro. Esta proteína funciona como um carreador lipofílico, carreando substâncias lipofílicas como as prostaglandinas, contudo sua relação com a fertilidade não está esclarecida.

Cardozo et al., (2006) concluíram que a maioria das proteínas encontradas no PS de carneiros da raça Rasa Aragoneza, tem um peso molecular abaixo de 75 kDa.

Os mesmos autores acharam diferenças entre as proteínas ao longo do ano e correlacionam esta diferença com a variabilidade encontrada na qualidade do sêmen durante as diferentes estações e épocas do ano (estação e contra estação reprodutiva). Neste estudo encontrou-se 13 proteínas que apresentam variações significantes durante a estação e contra estação reprodutiva. As frações 3 (15 kDa pI 5.6) e 15 (16.1 kDa pI 6.5) foram mais abundantes de maio a dezembro e

negativamente correlacionadas com a viabilidade espermática. A maior concentração destas duas proteínas durante o verão pode, segundo os autores, explicar a baixa qualidade espermática encontrada durante estes meses.

A fração 9 (73.2 kDa pI 5.0) diminui estatísticamente a partir do início do verão e está correlacionada com a viabilidade espermática. O que mais uma vez justificaria a baixa qualidade espermática durante os meses mais quentes. Esta proteína pode ter um efeito protetor na membrana espermática, mantendo a integridade da membrana e, portanto a funcionalidade do espermatozóide requerida para a capacitação, reação acrossomal e penetração do oócito (CARDOZO et al., 2006).

La Falci et al. (2002) também encontraram variações na presença de proteínas no sêmen de bodes de acordo com a época do ano.

2.2 Espécies Reativas do Oxigênio (ROS)

O termo metabólitos reativos do oxigênio ou espécies oxigênio reativas (ROS) é utilizado para identificar os intermediários químicos reativos do metabolismo do oxigênio. O termo radical livre não é o ideal para identificá-los, pois nem todos os radicais são livres, ou seja, nem todos apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS) são geradas e metabolizadas por todos os sistemas biológicos aeróbicos, que necessitam do oxigênio para seu funcionamento normal. Contudo quantidades excessivas de ROS são nocivas a suas funções e/ou a sua sobrevivência (GUERRA et al., 2004; MAIA, 2005).

Nestas condições fisiológicas do metabolismo celular, o O_2 sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons obtendo como resultado a formação de óxido de hidrogênio. Durante este processo outros intermediários reativos são formados, como os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2) e hidroxila (OH) e o não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria, e a reatividade das ROS é neutralizada pela entrada de quatro elétrons (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

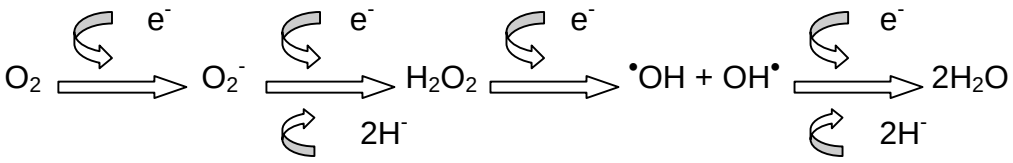


Fig. 1: Reação formadora de radicais a partir do O_2 (adaptado de NORDBERG & ARNÉR, 2001)

Os efeitos das ROS podem ser diminuídos ou prevenidos por enzimas como a superóxido desmutase (SOD), a catalase, as peroxidases (GPx e PHGPx) e agentes redutivos como as glutationas, o ácido ascórbico, taurina e hipotaurina presentes na célula espermática e no ambiente seminal (MEDEIROS et al., 2002).

2.2.1 Radical superóxido (O_2^-)

É formado após a adição de um elétron ao O_2. Ocorre em quase todas as células que utilizam o oxigênio em seu metabolismo sendo produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Como o O_2 não possui a habilidade de ultrapassar a membrana plasmática fica restrito ao ambiente onde for produzido (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Duas moléculas de superóxido desmutam rapidamente em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, sendo esta reação posteriormente potencializada pela superóxidodesmutase (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

2.2.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente tóxico para a célula devido a sua participação na reação que produz o radical hidroxila ($OH^•$), a partir da oxidação dos metais de transição. Apesar de não ser um radical livre, por não possuir um elétron desemparelhado na última camada, tem vida longa e é capaz de atravessar camadas lipídicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

2.2.3 Radical hidroxila (OH°)

O radical hidroxila é formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metal (ferro ou cobre) frequentemente ligada a um complexo com outras proteínas e moléculas, conhecida como reação de Fenton. A partir da reação de Fenton outra reação conectada ao superóxido novamente está relacionada a reciclagem dos íons metal, a de Haber-Weiss que também tem como produto final o radical hidroxila (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

O radical hidroxila é considerado a ROS mais reativa em sistemas biológicos devido a sua forte reatividade com as biomoléculas. A hidroxila, se produzida próxima ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, pode levar a inativação ou mutação do DNA. Além disso, a hidroxila pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados da membrana celular a lipoperoxidação (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

2.2.4 Óxido nítrico (NO)

Apesar de conter um elétron desemparelhado em sua última camada, o óxido nítrico não reage rapidamente com as biomoléculas como o superóxido. De outra forma ele rapidamente reage com outros radicais livres gerando moléculas muito menos reativas, agindo então como um varredor de radicais. Todavia, se altos níveis de superóxido forem produzidos juntamente com o óxido nítrico os dois reagem entre si formando o peroxinitrito ($OONO^{-}$) que é altamente citotóxico e reage facilmente com outras biomoléculas formando outros radicais (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Em concentrações fisiológicas o óxido nítrico age mais como um antioxidante do que como um oxidante (NORDBERG& ARNÉR, 2001).

2.3 Sistemas Antioxidantes

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que quando presente em menor concentração do que os substratos oxidáveis retarda significativamente ou previne a oxidação daquele substrato (HALLIWELL et al., 1995).

De modo geral os antioxidantes podem ser divididos em dois grupos, os enzimáticos (superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa (GSH), glutationa redutase (GR)), e os não enzimáticos (vitamina C e E, compostos de selênio, ácido úrico, entre outros) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Como forma de proteção contra as ROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante que pode atuar de duas formas. Uma delas é através da remoção do agente oxidante antes que ele cause a lesão. Fazem parte deste grupo a glutationa (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e a vitamina E. A outra forma de atuação dos antioxidantes é pela reparação da lesão já ocorrida, onde entram em ação a glutationa redutase (GR), ácido ascórbico, GPx, entre outros (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A importância relativa a estes antioxidantes depende do tipo de ROS gerada, como e onde foi gerada e qual o seu alvo. Uma vez ser totalmente possível para um antioxidante proteger um sistema, mas falhar na proteção de outros ou até mesmo em alguns casos causar algum dano (HALLIWELL et al., 1995).

2.3.1 Catalase

A catalase é uma hemi proteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e em oxigênio (O_2). Desta forma evita a formação do radical hidroxila pelo peróxido de hidrogênio através da reação de Fenton. Sua atividade depende da NADPH. A catalase se liga a NADPH a qual protege a enzima da inativação e aumenta a sua eficiência (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

2.3.2 α - Tocoferol (vitamina E)

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel presente nas membranas biológicas. Contém um grupo hidroxila que reage com elétrons desemparelhados reduzindo, por exemplo, os radicais peroxilas (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

A vitamina E inibe a lipoperoxidação primeiramente por inibir a reação formadora de hidroperóxidos de lipídeos (LOOH) a partir dos radicais peroxil (LOO), que por sua vez são gerados a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Como o LOO é acumulado rapidamente e em altas concentrações, o fato da vitamina E se ligar rapidamente e facilmente a este radical impedindo a continuação da cadeia da lipoperoxidação é um fator antioxidante importante para a célula. Por este fator a vitamina E é considerada como um antioxidante que "quebra a corrente" da lipoperoxidação. Da mesma forma ela também é capaz de reagir com outros radicais, não tão rapidamente como no caso do LOO, desde que este não seja uma molécula de oxigênio sozinha (LIEBLER, 1993).

Todavia, dependo dos compostos presentes na reação, a vitamina E pode ser antioxidativa ou favorecer a oxidação se o produto de sua ligação ao LOO, o radical tocoferol, retirar hidrogênio dos ácidos graxos polinsaturados induzindo a lipoperoxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A utilização da vitamina E como antioxidante deve levar em conta a concentração utilizada, uma vez que doses elevadas podem ser tóxicas para a célula (FUKUZAWA et al., 1985).

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

O Trolox é um análogo hidrofílico da vitamina E, desenvolvido originalmente em 1974 por Scott et al. *apud* Wu et al., (1990) como um antioxidante para a preservação de alimentos como óleos e gorduras.

O fato da maior parte das ROS como, por exemplo, o ânion superóxido, serem geradas na fase aquosa aumenta o interesse pelo uso de antioxidantes hidrossolúveis (SAGACH et al., 2002).

Wu et al. (1990) descreveram que a lipofilicidade e a retirada relativamente lenta da vitamina E pela célula, limita o seu uso clínico principalmente em emergências.

Aparentemente o Trolox é capaz de penetrar rapidamente as biomembranas, sendo um excelente protetor dos fosfolipídios de membrana contra o ataque peroxidativo. Seu mecanismo de ação antioxidante é semelhante ao da vitamina E, ou seja, pela remoção de radicais peroxil (DOBA et al., 1985).

2.4 Sistemas Oxidantes/ antioxidantes e a Função Espermática

2.4.1 Produção e Degradação das ROS no Sêmen

Como as enzimas antioxidantes intracelulares não conferem a proteção total à membrana plasmática, os espermatozóides adicionam a esta limitada defesa intrínseca a proteção conferida pelo plasma seminal, que contém antioxidantes enzimáticos (catalase, superóxido desmutase (SOD), glutationa peroxidase e glutationa redutase (GRD)) e não enzimáticos (vitamina C, vitamina E, urato, albumina, taurina e hipotaurina) (GUERRA et al., 2004).

A quantidade e presença de antioxidantes no sêmen, no caso de animais, dependem da espécie e também da fertilidade do individuo. Em humanos foi evidenciada uma menor concentração de glutationa peroxidase (GPx) no plasma seminal de homens subférteis e uma correlação positiva entre motilidade espermática e a quantidade desta enzima (RAIJMAKERS et al., 2003; GUERRA et al., 2004).

Assim como ocorre com as proteínas, a presença e quantidade de antioxidantes no sêmen ovino podem variar ao longo ano.

Acredita-se que os lipídeos da membrana plasmática, principalmente os presentes no acrossomo e gota citoplasmática são os mais susceptíveis a peroxidação (JONES et al., 1979; GUERRA et al., 2004).

Em estudo realizado em humanos por Jones et al. (1979), demonstrou-se a habilidade do plasma seminal em prevenir a lipoperoxidação e melhorar a motilidade dos espermatozóides, quando adicionado ao sêmen de homens com problemas de fertilidade.

Bilodeau et al. (2000) encontraram pequenas quantidades de glutationa peroxidase no espermatozóide bovino (6 nmoles NADPH oxidada min^{-1}/mg^{-1} proteína) enquanto uma maior quantidade foi observada no PS (204 nmoles NADPH oxidada min^{-1}/mg^{-1} proteína) já a atividade da catalase não foi detectada no espermatozóide e sim no PS (1.00 U/mg proteína). A atividade da superóxido desmutase (SOD) foi de 286 U/mg proteína no espermatozóide e 111 U/mg proteína no plasma seminal, a glutationa também apresentou uma maior atividade no espermatozóide do que no plasma seminal (566 x 17 U/mg proteína).

Diferentemente do espermatozóide bovino, uma maior atividade de catalase foi observada no plasma seminal de humanos (ZINI et al., 2000; ZINI et al., 2002) e em carneiros (NIVASARKAR et al. (1971) *apud* BILODEAU et al., (2000)).

Segundo Abu-Erreish et al. (1978) *apud* Maxwell & Stojanov (1996), o sêmen de carneiros é rico em superóxido desmutase (SOD) e possui pouca atividade de glutationa peroxidase (GP) e catalase (CAT). Os autores comentam que estas quantidades podem ser ainda menores com a diluição do sêmen.

Martí et al. (2003) também encontraram uma maior atividade de SOD do que de GPx ou da glutationa redutase no sêmen congelado e descongelado de carneiros. Os autores comentam que a maior variação nas atividades das glutationas e uma constancia maior na atividade da SOD também foi observada no sêmen de humanos por outros pesquisadores.

Cerolini et al. (2000) observaram uma atividade inicial crescente de vitamina E no sêmen de suínos incubado por 5 dias.

Diversos estudos confirmam e concluem que os produtos gerados a partir da metabolização do O_2 apesar de fazerem parte da fisiologia celular, quando produzidos em altas quantidades desencadeiam um processo oxidativo que termina com a morte celular (JONES & MANN, 1977 a e b; JONES et al., 1979; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; DE LAMIRANDE & GAGNON, 1999; NORDBERG & ARNÉR, 2001; GUERRA et al., 2004).

Uma série de componentes contidos no sêmen, incluindo espermatozóides morfologicamente anormais e/ou imóveis, leucócitos e células funcionalmente anormais são responsáveis pela geração de ROS no sêmen humano (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1999).

As ROS, especialmente o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO) desempenham um papel importante na seqüência de eventos que terminam com a capacitação espermática. Durante a capacitação as mudanças iônicas intracelulares precedem a geração de ROS, o que é necessário para que ocorra a fosforilação da proteína tirosina (MEDEIROS et al., 2002).

O uso fisiológico e vital das ROS pelas células tem sido demonstrado ultimamente em diferentes áreas incluindo a sinalização intracelular e a regulação redox. O óxido nítrico foi identificado como uma molécula sinalizadora e reguladora das atividades dos fatores de transcrição celular e de outros determinantes da expressão gênica. Diversas citocinas, fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores utilizam as ROS como mensageiros secundários na sinalização da transdução intracelular (NORDBERG & ARNÉR, 2001)

Altos níveis de produção de ROS no sêmen estão geralmente associados com a presença de espermatozóides anormais e de neutrófilos, o que induz a lipoperoxidação que por sua vez modifica a permeabilidade e a fluidez da membrana plasmática (AITKEN, 1999; DE LAMIRANDE & GAGNON, 1999).

Em humanos, a retenção de citoplasma residual (gota citoplasmática) pela célula espermática é positivamente correlacionada à produção de ROS através de mecanismos mediados pela enzima glucose-6-fosfatase desidrogenase. Esta enzima controla a taxa do fluxo de glucose que por sua vez controla a disponibilidade de NADPH intracelular. Esta última é utilizada como fonte de elétrons pelo espermatozóide como combustível para a formação de ROS por um sistema enzimático, o NADPH-oxidase. Porém, quando a retenção de citoplasma residual ocorre em excesso aumenta a atividade da enzima glucose-6-fosfatase desidrogenase que por sua vez vai desencadear a excessiva produção de NADPH levando a alta produção de ROS iniciando a cascata da lipoperoxidação com conseqüente perda da função espermática (AITKEN, 1999).

Os neutrófilos, células do sistema imune, quando em ação aumentam o consumo de oxigênio ativando a enzima NAPH-oxidase da membrana e assim produzem ROS como o ânion superóxido e o radical hidroxila. Todavia, a presença de neutrófilos se torna importante no caso de fertilização assistida, onde estes podem ser levados junto durante a preparação do sêmen, ou no caso de infecções testiculares ou epididimárias agudas em que o espermatozóide estará

em contato direto com os neutrófilos potencialmente ativos sem contar com a ação protetora do plasma seminal (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1999).

A lipoperoxidação e a fragmentação do DNA vêm sendo correlacionadas à exposição do espermatozóide as ROS. De modo que, a excessiva formação de ROS pela célula está associada com a diminuição da motilidade, anormalidades morfológicas e baixa capacidade de penetração no oócito (POTTS et al., 2000).

A célula espermática é particularmente sensível ao estresse oxidativo devido aos fosfolipídios presentes na membrana plasmática, da inabilidade de re-síntese dos componentes da membrana e de baixa capacidade antioxidativa. A peroxidação dos lipídeos leva a desestabilização da membrana, modificando a atividade das enzimas ligadoras da membrana o que resulta em morte celular (MEDEIROS et al., 2002).

O mecanismo gerador das ROS ainda não foi totalmente esclarecido, mas a sua formação, a partir da redução incompleta do O_2^- na cadeia respiratória, ocorre no espermatozóide assim como ocorre em todos as células aeróbicas que utilizam o metabolismo respiratório gerando ATP a fim de satisfazer a demanda bioenergética. Contudo o sistema NADPH oxidase, geradora de O_2^- na membrana espermática, que inicia a sua atividade a partir da remoção do plasma seminal, pode ser uma das causas da formação das ROS (MEDEIROS et al., 2002).

A adição de NADPH (20 mM) acarreta em um aumento na produção de O_2^- levando a uma diminuição da motilidade, hiperativação e capacitação espermática, o que pode ser prevenido através da combinação da catalase e superóxidodesmutase (SOD) (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1999).

A diaforase espermática, que é uma oxidoredutase NADPH dependente de origem mitocondrial é provavelmente a maior fonte de ROS produzida pelo espermatozóide em homens inférteis. Uma vez que dois terços destas ROS foram detectadas intracelularmente apenas um terço das ROS são liberadas para o meio extracelular o que levou Plante et al. (1994) a sugerirem a diaforase como a maior fonte produtora de ROS intracelular.

Aitken et al. (1996) se surpreenderam ao encontrar, em humanos, uma maior atividade da enzima SOD na população de espermatozóides defeituosos (baixa densidade), separados por gradiente Percoll. Esta população também exibiu um nível maior de lipoperoxidação (9,1 nmol TBARS/10^8 sptz) quando comparados a

fração de alta densidade (2,1 nmol TBARS/10^8 sptz). Os autores concluem que a associação entre a maior atividade da SOD e função espermática defeituosa reflete a presença de precursores de células germinativas e de citoplasma residual nas células espermáticas, a indução direta da lipoperoxidação devido à produção excessiva de H_2O_2e a remoção do ânion superóxido que é importante no processo de capacitação.

2.4.2 ROS e Capacitação Espermática

As ROS são espontaneamente geradas pelos espermatozóides dos mamíferos assim que deixam a cauda do epidídimo. Apesar das células de todas as regiões do epidídimo serem capazes de gerar o ânion superóxido (O_2^-), apenas os espermatozóides da cauda do epidídimo têm a competência em produzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sugerindo que estes metabólitos do metabolismo do oxigênio estariam envolvidos na regulação da função espermática (AITKEN, 2000).

Até o momento muitos autores concordam no papel das ROS (quando em baixas quantidades), principalmente o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, na capacitação espermática, hiperativação da motilidade, reação acrossomal e fusão com o oócito em diferentes espécies, como em humanos (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992; AITKEN et al., 1993; DE LAMIRANDE et al., 1997; GRIVEAU & LANNOU, 1997; VILLEGAS et al., 2003), em bovinos (O'FLAHERTY et al., 2003) e equinos (BAUMBER et al., 2003).

Em bovinos, O'Flaherty et al. (2003) concluíram que o O_2^- exógeno atua de forma determinante no processo de capacitação fisiológica do espermatozóide criopreservado, uma vez que a adição de SOD inibiu a capacitação mesmo na presença da heparina e da catalase.

2.4.3 Interações das ROS com os Espermatozóides

Todos os componentes celulares são alvo das ROS, os lipídios, proteínas, ácidos nucléicos e açucares. Contudo, o tipo e extensão das modificações causadas dependem não apenas do tipo e quantidade de ROS envolvidas, mas também do momento e duração da exposição a estes fatores e também de fatores extracelulares como a temperatura, oxigênio disponível e da composição do meio de incubação (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992).

A peroxidação dos lipídeos da membrana é o efeito causado pelas ROS que foi primeiramente descoberto e estudado. Hoje já se sabe que as ROS também oxidam o DNA, afetam a produção de ATP e NADPH e a condensação do DNA (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992; DE LAMIRANDE & GAGNON, 1999).

a) Lipoperoxidação

Apesar de todos os componentes celulares serem susceptíveis a ação das ROS a membrana, que possui grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados, é um dos mais atingidos, devido a peroxidação lipídica que causa alterações em sua estrutura e em sua permeabilidade. Com isso ocorre a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos, como o malonaldeído (MDA), terminando com a morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Os radicais peroxila (LOO) e os hidroperóxidos (LOOH) gerados pelas ROS atacam os fosfolipídios da membrana celular, assim como os resíduos de sua degradação como o MDA, afetam a função espermática (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1999).

O radical hidroxila e o ferro são responsáveis pelo início da reação de lipoperoxidação (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A hidroxila capta um átomo de hidrogênio do ácido insaturado da membrana fosfolipídica e se transforma em água. O ácido graxo em presença de oxigênio transforma-se em um radical livre e dá início a uma reação que termina com a destruição da membrana celular. Este processo é chamado de peroxidação de

lipídios. Lesada, a membrana perde sua flexibilidade e suas funções de barreira e de ligação (FERREIRA & MATSUBARA, 1997, NORDBERG & ARNÉR, 2001)

Para que a reação em cadeia formadora das ROS não evolua, um radical recém formado deve ou reagir com outro radical livre, eliminando o elétron desemparelhado, ou reagir com um varredor de radicais livres (antioxidantes) (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

O teste mais comumente utilizado para medir peroxidação dos lipídeos é o da reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS) para o malonaldeído (MDA) que é o produto final da lipoperoxidação. No início da lipoperoxidação ocorre o acúmulo de hidroperóxidos de lipídeos na membrana celular que vão se decompor formando aldeídos como o MDA (AITKEN, et al., 1993).

Em humanos, Aitken et al. (1993) concluíram que há uma correlação positiva entre a porcentagem de células mortas ou anormais e produção de MDA. A fração de baixa densidade (espermatozóides mortos ou anormais), recuperada por gradiente Percoll, produziu mais MDA do que a fração de alta densidade (12,8 x 4,4 MDA/ 10^{8} sptz).

Kasimanickam et al. (2006) encontraram maiores níveis de MDA no sêmen de borregos que apresentaram índices insatisfatórios no exame andrológico, ou seja, com maior porcentagem de células morfologicamente anormais e com menor motilidade progressiva.

Apesar de terem encontrado diferenças estatísticas quanto a capacitação, Peris et al. (2006) não encontraram diferenças quanto a lipoperoxidação comparando o sêmen de carneiros fresco e congelado (0,015 a 0,023 mM MDA + 4-HNE/mg proteína x 0,020 a 0,030 mM MDA + 4-HNE/mg proteína, respectivamente), mesmo após a adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em diferentes períodos de incubação.

2.5 Efeitos da Adição de Plasma Seminal e Antioxidantes na Viabilidade Espermática

O plasma seminal contém fatores que podem influenciar a viabilidade espermática. Esta conclusão é baseada na observação de que o espermatozóide pode morrer se a concentração do PS em seu ambiente estiver reduzida através de diluição ou lavagem (BARRIOS et al., 2000).

A diluição do espermatozóide de mamífero com pequenos volumes de solução salina ou outra solução isotônica produz ativação da motilidade. Contudo se esta diluição for excessiva levará a uma perda permanente da motilidade, atividade metabólica e capacidade fertilizante *in vivo*, efeito conhecido como “efeito diluição” (MAXWELL & JOHNSON, 1999).

Uma influencia positiva ou negativa em relação à motilidade espermática e resistência ao choque térmico tem sido demonstrada através da adição ou retirada do plasma seminal. Tais controvérsias indicam que o PS é uma mistura complexa contendo uma variedade de componentes que afetam a sobrevivência e a motilidade espermática (BARRIOS et al., 2000).

As conclusões sobre o papel do PS na fertilidade de espermatozóides são conflitantes. Em algumas espécies ocorreu um aumento na fertilidade após a adição de componentes do PS em outros houve a diminuição. Variações na presença ou não de concentrações críticas de certos componentes, provavelmente proteínas contidas no PS, podem ser responsáveis por estas diferenças nas taxas de fertilidade. Todavia, o fato da maior parte do plasma seminal não acompanhar o espermatozóide ao local de fertilização, no trato reprodutivo feminino, sugere que sua remoção é necessária para a aquisição da capacidade fertilizante, e pode desempenhar um importante papel no processo de capacitação (MAXWELL & JOHNSON, 1999).

Os fatores responsáveis pela modulação da capacitação são provavelmente do grupo das proteínas ligadas a heparina.

Maxwell et al. (1999) demonstraram que após a adição de 20% de plasma seminal, diluído em PBS, ao espermatozóide congelado e descongelado a motilidade se mostrou mais alta e haviam poucos capacitados e com acrossomo

reagido (o que pôde ser conferido pela coloração com clortetraciclina, (CTC)), quando comparados ao grupo onde não foi adicionado o PS.

No mesmo estudo os autores avaliaram as taxas de prenhez após a IA cervical, em ovelhas, onde em um grupo utilizou-se o sêmen congelado com a adição do PS após a descongelação, e outro grupo adicionando apenas uma solução tampão. As taxas de fertilidade foram maiores no grupo com o PS (51 vs 28%). Estes resultados mostram que apesar do comprometimento funcional causado pela criopreservação, a adição do plasma seminal pode levar a resultados satisfatórios de prenhez quando se utiliza a IA cervical com sêmen congelado na espécie ovina.

Silva et al., (2005) obtiveram bons resultados de fertilidade (74%) quando adicionaram o PS após a criopreservação do sêmen ovino utilizando a inseminação pela via cervical, apesar de os índices de prenhez do grupo controle também terem sido bons quando consideramos a técnica de inseminação utilizada (60%).

Proteínas isoladas do plasma seminal de carneiros, frações 3, 6 e 7 foram capazes de reverter o choque térmico induzido, sofrido pelo espermatozóide, em um trabalho desenvolvido por Barrios et al. (2000), onde ficou demonstrado que a adição destas frações proteicas isoladas do plasma seminal de carneiros, bem como uma única determinada fração, fração 6, foram capazes de reverter os efeitos causados pelo choque térmico, possivelmente devido a adsorção destas proteínas pela superfície da membrana plasmática, o que foi identificado através da microscopia eletrônica e sondas fluorescentes.

Metabólitos simples ou componentes iônicos, além das proteínas mostraram habilidade em manter a viabilidade espermática em búfalos e carneiros, quando Catt et al. (1997) utilizaram a *Beltsville Tawing Solution* (BTS 20) com ou sem a adição do plasma seminal. Ou seja, outros componentes podem ser importantes além das proteínas.

A adição de um plasma seminal artificial (ASP) utilizado primeiramente por O'Donnell em 1969, em bovinos, ao espermatozóide de carneiros mostrou-se melhor em estabilizar os efeitos da criopreservação quando comparados com o plasma seminal (SP) e o controle (PBS). A pesar de o plasma seminal ter se apresentado superior ao grupo controle, os padrões de CTC observados quando

da utilização do ASP surpreenderam os autores que discutem não haver diferenças entre a solução controle e o ASP além dos sais nele contido (MORTIMER & MAXWELL, 2004).

Potts et al. (2000) adicionando diferentes volumes de plasma seminal ao espermatozóide humano congelado, 0, 10, 20, 40 e 60% (v:v) verificaram que a adição de 40 ou 60% (v:v) foi capaz de proteger melhor os espermatozóides, produzindo menores índices de lipoperoxidação e dano ao DNA celular, mesmo com a adição de peróxido de hidrogênio as amostras.

A adição de plasma seminal de bovinos ao espermatozóide ovino foi capaz de produzir menores taxas de lipoperoxidação (10 nmol MDA/ 10^9 sptz) (TBARS) quando comparado à adição do plasma seminal ovino, humano e eqüino (122, 120, 132 nmol MDA/ 10^9 sptz respectivamente). Apesar deste fato não ser explicado pelos autores, estes acreditam que o fato do espermatozóide bovino ser mais resistente a peroxidação quando comparado as demais espécies, devido a alta quantidade de fosfolipídios insaturados presentes na célula, é o caminho para a resposta aos resultados obtidos neste estudo (JONES & MANN, 1977b).

Em algumas espécies a retirada do PS, antes da diluição e congelação do sêmen**,** através de centrifugação resulta em melhor congelabilidade do espermatozóide levando a melhores índices de fertilidade, como no eqüino (PESCH et al., 2006) e no caprino (EVANS & MAXWELL, 1987) .

Em ovinos, em trabalho realizado por Oba et al., 2004, observou-se um melhor resultado quanto à integridade de membrana nas amostras de sêmen congelado sem a presença do plasma seminal (27,1 vs 22,8%).

Para Jones & Mann em 1997a, a presença de fosfolipídios no plasma seminal pode ser responsável pela indução da lipoperoxidação o que justificaria sua toxicidade ao espermatozóide.

No caso do espermatozóide que passou pelo processo de sexagem, através do citometro de fluxo, a adição do PS não mostrou diferença nos padrões de cinética espermática, como a motilidade total, bem como na integridade de membrana quando comparado ao grupo em que não houve adição do PS. Este fato pode ser atribuído ao processo de sexagem ao qual o espermatozóide foi submetido e que deve alterar as proteínas presentes na superfície da membrana

expondo a célula aos possíveis efeitos deletérios contidos no PS (GRAAF et al., 2006).

Na tentativa de contornar os efeitos oxidativos causados pelas ROS durante a criopreservação, alguns autores vêm estudando a adição de antioxidantes iguais ou análogos aos mesmos contidos no PS.

Pena et al. (2003), utilizaram no sêmen de suínos o análogo da vitamina E, o Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxilic acid), adicionado ao diluidor durante o processo de resfriamento para posterior congelação. Duas concentrações do antioxidante foram testadas 100 e 200 μM l^{-1}. As amostras foram avaliadas após 30 e 120 minutos de incubação pós descongelação. As duas concentrações demonstraram melhores valores quanto a motilidade progressiva quando comparadas ao controle, porém as amostras com maior tempo de incubação, 120 minutos, apresentaram resultados ainda melhores se comparadas as com 30 minutos. O potencial de membrana também foi avaliado através da coloração JC – 1. A suplementação com o antioxidante aumentou significativamente o número de células com alto potencial de membrana, sendo que a concentração de 200μM l^{-1} se apresentou ainda mais eficiente.

Em carneiros, diferentes concentrações de Trolox foram testadas 50, 100, 150 e 200 μM adicionadas ao meio diluidor antes da congelação do sêmen, mas nenhuma delas foi diferente do controle quanto a motilidade total, padrões de cinética (RAP, VAP, VCL E ALH) e integridade de membrana. Contudo um efeito deletério na motilidade total foi observado nas amostras com as concentrações de 150 e 200 μM. Desta forma, os resultados indicam que concentrações elevadas de Trolox são tóxicas ao espermatozóide (SICHERLE et al., 2006).

Além da vitamina E outras substâncias antioxidantes vêm sendo pesquisadas. Maxwell & Stojanov (1996) utilizaram a superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), citocromo c (CHc) e a glutationa peroxidase (GP) . Todos os antioxidantes melhoraram a motilidade e integridade de membrana dos espermatozóides mantidos a 5°C por até 6 dias. A soma da catalase e a SOD teve um efeito aditivo sobre a motilidade e sobrevivência dos espermatozóides. A taxa de fertilização também foi maior no grupo no qual o sêmen foi diluído em meio contendo SOD e CAT, armazenado por 6 dias a 5°C e inseminado por via laparoscópica (SOD, 50%; CAT, 50% vs controle 15%).

Upretti et al. (1997), não observaram diferenças estatisticas quanto a manutenção da motilidade após a incubação do sêmen de carneiros por 24h a 38°C ao utilizarem a vitamina E (10 mM) e a catalase (45µg/mL) adicionadas ao meio diluidor.

Maia em 2006 utilizando a catalase (50 µg/mL) e o Trolox (50µMol/100 x 10^6 sptz) separadamente ou juntos adicionados ao meio diluidor antes da congelação do sêmen ovino, observou após a descongelação, que em relação a motilidade espermática o Trolox e o Trolox + catalase obtiveram um valor inferior quando comparado a catalase e ao grupo controle. Quanto à integridade de membrana plasmática e acrossomal, a autora pôde observar um efeito benéfico na adição da catalase e do Trolox separadamente. Porém nas concentrações utilizadas a adição destes antioxidantes não se mostrou diferente em relação ao controle quanto a diminuição ou neutralização na produção das ROS.

Após a adição de α-tocoferol (0,2 mg/mL) ao sêmen de suínos e incubação por 5 dias a 19°C, Cerolini et al. (2000) observaram que a adição do α-tocoferol foi benéfica, prevenindo a diminuição da viabilidade espermática (menor número de células lesadas) durante os 5 dias e também apresentou menores índices de lipoperoxidação quando comparado as amostras controle (7,4 µg MDA/ 10^9 sptz x 18,9 µg MDA/ 10^9 sptz no 3° dia de incubação e 6,5 µg MDA/ 10^9 sptz x 28,6 µg MDA/ 10^9 sptz no 5° dia).

Ollero et al. (1996) observaram bons resultados de viabilidade espermática utilizando 3,2 mM de vitamina E adicionados ao meio diluidor após a congelação e descongelação do sêmen de carneiros, quando comparado ao controle (27,3% x 18,97 % do grupo controle).

A adição de catalase em diferentes concentrações (1, 10, 100 e 200 µg/mL) ao sêmen de bovinos resfriado por dias a 5°C foi benéfico na manutenção da motilidade espermática para todas as concentrações em comparação ao controle. Porem, acima de 100 µg/mL não houve melhora estatística em relação as demais concentrações (FOOTE, 1962).

2.6 Criopreservação do Sêmen

Os primeiros relatos de congelação bem sucedida com sêmen de carneiro foram feitos por pesquisadores russos que em 1937 utilizaram uma solução contendo 9,2% de glicerol para o congelamento de sêmen de mamíferos (coelhos, carneiros, touros, cachaços e garanhões) e de aves a -21˚C. Contudo o espermatozóide ovino continua susceptível a lesões causadas pelo processo de criopreservação o que acarreta em uma diminuição da população de células móveis e em baixos índices de fertilidade após a inseminação cervical (SALAMON & MAXWELL, 1995; SALAMON & MAXWELL, 2000).

Apesar de uma população dos espermatozóides preservar sua motilidade após a congelação e descongelação, apenas uma pequena porção, 20-30%, permanecem biologicamente intactos. O espermatozóide pode estar móvel, porém lesado e este fato coloca em dúvida seu poder de fertilização. A crioinjuria causada ao espermatozóide pode ser estrutural (física), bioquímica ou funcional. O dano estrutural ou físico ocorre na membrana plasmática e acrossomal, no acrossomo, mitocôndria e axonema. As mudanças bioquímicas incluem a liberação da transaminase oxaloacética glutâmica, perda de lipoproteínas e aminoácidos, diminuição da atividade da fosfatase, perda do poder de ligação à proteína do colesterol, aumento do sódio e diminuição do potássio intracelular, inativação da hialuronidase, perda de prostaglandinas, redução na síntese de ATP e ADP e diminuição na atividade proteolítica acrossomal (SALAMON & MAXWELL, 1995; AZEVEDO, 2006; MAIA, 2006; SOUZA, 2007).

As mudanças estruturais e bioquímicas causadas pela criopreservação ao espermatozóide podem ser responsáveis pelas alterações na integridade funcional da célula, sua sobrevivência *in vivo* e capacidade fertilizante (SALAMON & MAXWELL, 2000).

A célula sobrevivente ao processo de congelação e descongelação demonstra um estado alterado da membrana, similar ao que ocorre no processo de capacitação ou reação acrossomal (WATSON, 1995; GILLAN et al., 1997).

A capacitação é um pré-requisito necessário para que ocorra a fertilização. Apesar de alguns eventos continuarem não esclarecidos, a capacitação engloba a remoção de componentes da membrana plasmática e a saída de cálcio antes que reação acrossomal seja induzida (GILLAN et al., 1997).

Diversos estudos demonstraram que após a congelação e descongelação grande parte dos espermatozóides apresentam um padrão semelhante a capacitação (GILLAN et al., 1997; MAXWELL et al., 1999; MORTIMER & MAXWELL, 2004; AZEVEDO, 2006).

Gillan et al. em 1997, confirmaram que após a congelação e descongelação a maior parte dos espermatozóides apresentam um padrão similar à capacitação, o que pôde ser conferido através de sonda fluorescente utilizando a Clortetraciclina (CTC), onde 65,9 % das células apresentavam o padrão semelhante à capacitação.

Através da utilização do CTC Pérez et al., (1996) observaram que o espermatozóide ovino que passa pelo processo de congelação e descongelação e que embora pareça estar morfologicamente intacto ao ser submetido à uma capacitação induzida, esta ocorre de maneira mais acelerada quando comparado ao sêmen fresco. Desta forma os autores concluíram que o processo de criopreservação acelera o processo de capacitação.

O próprio processo de congelação é uma etapa crítica uma vez que a temperatura e a velocidade de congelação são cruciais à sobrevivência e à manutenção da capacidade de fertilização do espermatozóide. Durante o processo, quando a temperatura chega ao redor de - 5˚C a água intra e extracelular permanece em um estado super-resfriado e não congelado, mas entre - 5˚C e - 10˚C ocorre a formação de gelo no meio extracelular, enquanto que a água intra-celular permanece super resfriada este equilíbrio permite a desidratação celular. Neste ponto a taxa de resfriamento deve ser lenta o suficiente para permitir que a desidratação ocorra, evitando que a água intracelular congele, e rápida o bastante para evitar que a célula se exponha ao meio hiper-osmótico crescente subseqüente a desidratação. Uma desidratação extrema leva a injurias como o efeito solução causado pela

desnaturação de macromoléculas e um encolhimento excessivo da célula levando ao colapso irreversível da membrana (MEDEIROS et al., 2002).

A curva de congelação mais apropriada é rápida o suficiente para permitir o congelamento da água extracelular sem que ocorra a formação de gelo intracelular (MEDEIROS et al., 2002).

O uso de crioprotetores permeáveis adicionados aos meios diluidores, como o glicerol, é importante para evitar a formação de gelo intracelular (GAO et al. apud MEDEIROS et al., 2002).

A composição do meio diluidor, agentes crioprotetores, o processo para congelação, a metodologia de congelação e descongelação do sêmen são questões muito estudadas e bastante importantes para a preservação da capacidade fertilizante do espermatozóide (SALAMON & MAXWELL, 1995; SALAMON & MAXWELL, 2000).

2.6.3 Meio Diluidor

O diluidor utilizado para a preservação do sêmen deve ter um pH adequado, capacidade tamponante, osmolaridade compatível e deve proteger o espermatozóide contra crio injurias (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Diversos ingredientes têm sido utilizados como base para diluição e posterior congelação do sêmen ovino como o citrato, o leite, a lactose, sacarose, rafinose, TRIS (tris-hidroximetil aminometano) entre outros (SALAMON & MAXWELL, 2000).

A pesar dos meios a base de TRIS serem os mais comumente utilizados, Gonzalez (1996) não observou diferença estatística nos resultados quanto a preservação da membrana plasmática e a taxa de gestação com a utilização de meio composto por glicina, gema de ovo e leite desnatado quando comparado ao meio contendo TRIS (48,1% e 55,5% para porcentagem de membranas íntegras e 88% e 86% para taxa de gestação respectivamente). A autora conclui que os resultados obtidos quanto a integridade de membrana neste experimento se devem a combinação de ingredientes crioprotetores contidos no meio Glicina-Gema-Leite: o glicerol, 20% de gema de ovo, glicina, *orvus es paste* e as macromoléculas do leite.

A gema de ovo também pode ser considerada um crioprotetor, ela é um componente presente na maioria dos diluidores e ao que parece seu efeito protetor é efetivo quanto aos danos causados à membrana plasmática (perda de fosfolipídios) e à motilidade dos espermatozóides durante os processos de resfriamento e congelação (HOLT et al., 1992; SALAMON & MAXWELL, 2000).

O glicerol, em diferentes concentrações, é o crioprotetor comumente adicionado aos diluidores para a congelação do sêmen de carneiros (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Trata-se de um crioprotetor penetrante, mas semelhante aos não penetrantes exerce um efeito extracelular pela estimulação osmótica da desidratação celular diminuindo o volume de água intracelular disponível para congelar. Seu papel intracelular é o de ocupar o lugar da água intracelular necessária para a manutenção do volume celular, interagir com as macromoléculas e íons diminuindo o ponto de congelamento da água. Por ser penetrante, sua concentração deve ser controlada para que não ocorra intoxicação ou perda da função celular (SALAMON & MAXWELL, 2000; MEDEIROS et al., 2002; GIL et al., 2003).

2.6.4 Avaliação das Membranas Espermáticas

O fato de o espermatozóide apresentar-se móvel após o processo de congelação e descongelação, não quer dizer que o mesmo será capaz de realizar a fertilização. Definitivamente estes processos alteram a condição da membrana plasmática e de outros componentes da célula espermática.

Uma membrana plasmática funcionalmente intacta é um pré-requisito para a sobrevivência e função espermática. A membrana age não somente como um limite para o citoplasma celular, mas sua semi-permeabilidade mantém um gradiente químico de íons e solutos e também segura estruturas proteicas específicas importantes que agem como transporte para a água, fontes de substratos energéticos e receptores sinalizadores, todos relevantes para o metabolismo espermático e sua habilidade em interagir com o meio. A perda desta integridade funcional ameaça a funcionalidade e a vida do espermatozóide

em vários níveis, da capacidade fertilizante até a morte celular (RODRIGUEZ-MARTINEZ & BARTH, 2006).

Os testes comumente utilizados para verificar o estado da membrana plasmática combinam sondas corantes impermeáveis como a eosina, a Hoechst 33252, a rodamina e o iodeto de propídeo (IP), combinadas ou não as sondas permeáveis como o diacetato de carboxifluoresceína (DIC) (RODRIGUEZ-MARTINEZ & BARTH, 2006).

A avaliação quantitativa através da combinação das sondas IP e DIC foi descrita por Harrison & Vickers em 1990, onde as células com a membrana íntegra apresentam a fluorescência verde (DIC) e as com membrana lesada vermelha (IP).

Uma das avaliações utilizadas para a constatação dos danos causados a membrana é o que utiliza o antibiótico fluorescente Clortetraciclina (CTC). Neutro e não complexo o CTC atravessa a membrana celular e penetra nos compartimentos intracelulares contendo cálcio livre. Uma vez dentro destes compartimentos o CTC se torna negativamente carregado desta forma pode se ligar a este cálcio livre tornando-se mais fluorescente. Este complexo CTC-cálcio preferencialmente se liga a regiões hidrofóbicas, como a membrana plasmática, resultando em padrões de coloração característicos das várias fases transitórias exibidas pela membrana do espermatozóide (GILLAN et al., 1997; MAXWELL et al., 1999; MORTIMER & MAXWELL, 2004).

Ward & Storey (1984) avaliando o sêmen de ratos através do CTC definiram os padrões de coloração encontrados como padrão F para as células intactas, não capacitadas, padrão B para as com alterações semelhantes à capacitação e padrão AR para as com acrossomo regido.

Utilizando o CTC Gillan et al. (1997) encontraram 65,9% dos espermatozóides, congelados e descongelados, com padrão semelhante a capacitação (padrão B) e 25,9% com acrossomo regido (padrão AR) e apenas 6,7% de células intactas (padrão F). Maxwell et al. (1999) também encontraram a maior parte das células com padrão B, após serem congeladas e descongeladas.

Azevedo (2006) também observou que após a criopreservação do sêmen ovino a maior parte das células apresenta o padrão B ou AR. Comparando o sêmen fresco (SF), resfriado (SR) e congelado (SCD) os resultados para os

padrões F, B e AR obtidos pelo referido autor foram respectivamente: 78,9%; 11,8% e 9,3%(para o SF); 61,0%; 26,2% e 12,9% (para o SR); 14,9%; 34,0% e 51,1% (para o SCD).

3 HIPÓTESE

A adição de plasma seminal ou dos antioxidantes catalase e Trolox ao sêmen ovino, após a congelação e descongelação, incrementam a viabilidade espermática, produzindo menores índices de lipoperoxidação, geração de H_2O_2 e previne as mudanças semelhantes a capacitação no espermatozóide criopreservado.

4 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da adição de plasma seminal e dos antioxidantes catalase e Trolox, nas concentrações utilizadas, sobre o sêmen ovino congelado e descongelado, quanto as características de cinética espermática.

Avaliar a integridade de membrana e capacitação espermática através do uso de sondas fluorescentes.

Avaliar os níveis de lipoperoxidação e produção de peróxido de hidrogênio no sêmen congelado e descongelado adicionado de plasma seminal, catalase ou Trolox.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de estudos em Biotecnologia Aplicada a Reprodução de Ovinos e Caprinos, 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) – Botucatu – São Paulo e a colheita e processamento do sêmen foi realizado no laboratório da Fazenda da Barra – Itatinga – São Paulo, local onde se encontravam os carneiros utilizados.

5.2 Animais Experimentais

Foram utilizados treze carneiros da raça Santa Inês, com idade entre 12 e 36 meses, andrologicamente aptos segundo os parâmetros utilizados por Fonseca et al. (1992), submetidos ao manejo nutricional da propriedade que constava de uma ração balanceada contendo um concentrado a base de milho, soja e farelo de trigo, volumoso (feno de gramínea), sal mineral e água à vontade.

Foi coletado um ejaculado de cada carneiro por meio de vagina artificial, utilizando ovelhas em estro.

5.3 Procedimentos Experimentais

5.3.1 Análise pré-criopreservação

Após a colheita cada ejaculado foi avaliado quanto aos parâmetros espermáticos:

- Volume do ejaculado (mL) e aspecto no próprio frasco coletor
- Motilidade convencional (0 – 100%) e vigor (0 – 5). Para a realização destas avaliações, uma alíquota de sêmen *in natura* (10µL) foi diluída em meio X-Cell® (0,250 µL) mantido 37°C e após a confecção de lâmina

pré-aquecida também a 37°C as amostras foram posteriormente analisadas em microscopia óptica em aumento de 200X.

Os ejaculados que apresentaram motilidade convencional igual ou superior a 80% foram utilizados para a congelação.

A concentração espermática ($x10^6$) foi determinada com o uso da câmara de Neubauer após a diluição do sêmen (10 µL) em 4,0 mL de água destilada, em uma diluição final de 1:400.

5.3.2 Diluição do sêmen

Todos os ejaculados aprovados foram diluídos em meio Glicina Gema Leite – GGL (pH 7,22 e osmolaridade 309) (GONZALEZ, 1996) (Anexo 1-9.1) em duas etapas, descritas abaixo, obtendo-se a concentração final de 400 x 10^6 espermatozóides/mL.

- 1ª etapa

Após o cálculo do rendimento de cada ejaculado, levando-se em conta que cada palheta possuía a concentração de 400 x 10^6 espermatozóides mL, a primeira parte do meio (Meio I) sem o glicerol foi primeiramente adicionada, chegando a um volume de 50% do volume total final.

- 2ª etapa

Após a primeira diluição foi feita a análise quanto à motilidade convencional em microscopia de luz no intuito de averiguar possíveis interações desfavoráveis.

Em seguida o restante do meio diluente (Meio II), contendo o glicerol era adicionado, obtendo-se o volume final.

Outra análise de motilidade foi realizada após a adição do Meio II.

Durante toda a diluição do sêmen as amostras e os meios diluentes foram mantidos em banho-maria a 32°C.

5.3.3 Congelação do sêmen

A criopreservação do sêmen foi feita em uma máquina de sistema automatizado de refrigeração e congelação (modelo Tetakon® - TK 3000, TK Tecnologia em congelação Ltda), composta de uma unidade de monitoramento e

refrigeração, um cilindro porta-palhetas e uma caixa plástica térmica como recipiente para nitrogênio líquido.

Após o envase as palhetas foram colocadas no cilindro porta-palhetas, previamente aquecido a 32°C, em posição vertical e submetidas ao processo de refrigeração e congelação na curva P3 S1 do equipamento. Neste programa a curva de refrigeração de 32°C a 5°C ocorre a uma taxa de 0,25°C/min. Atingindo os 5°C as palhetas eram mantidas nesta temperatura até completar 120 minutos desde o início da refrigeração (RODELLO, 2006).

Logo após o cilindro foi colocado na caixa contendo nitrogênio líquido até a marcação indicada pelo fabricante e a curva de congelação era iniciada (-20°C/min até atingir -120°C).

Ao final do procedimento as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijão criogênico a -196°C até o momento da descongelação e análise.

5.3.4 Descongelação das amostras

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 40°C por 20 segundos (SOUZA et al., 1999) e posteriormente o volume de cada palheta (200 µL) era colocado em tubos eppendorfs de 1,5 mL previamente aquecidos a 37°C contendo:

- Grupo CO (controle): 200µL PBS (BARTH, 1989) (Anexo 1-9.2)
- Grupo CAT (catalase): 12,5 mg/mL (0,187 U/mL)= 8 µL + 192 µL PBS = 200µL
- Grupo TRO (Trolox): 100 µMol/ 100 x 10^6 sptz = 3,4 µL + 196,6 µL PBS
- Grupo PS: 60% de plasma seminal em PBS = 200 µL

O plasma seminal na concentração de 60% em PBS foi obtido da seguinte forma:

- Foram colhidos ejaculados de três carneiros da raça Santa Inês. A cada colheita os ejaculados dos três animais eram misturados e logo após foram submetidos a centrifugação, em centrífuga refrigerada a 4000xg (centrífuga MLW- K23 – DDR) por 15 minutos. Logo após o sobrenadante foi retirado e novamente centrifugado, na mesma velocidade e tempo.

Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi retirado e filtrado em filtro de 0,22µm, armazenado em tubos de 1mL e congelados em temperatura abaixo de -20°C até a sua utilização (MORTIMER &MAXWELL, 2004).

Para os antioxidantes foi seguida a seguinte metodologia (MAIA, 2006):

- Catalase 12,5 mg/mL: 0,0125g de catalase diluídos em 1,0 mL de tampão Tris.
- Trolox 10 mM: 0,0125g de Trolox para 5 mL de tampão Tris.

As soluções contendo os antioxidantes foram preparadas e armazenadas em mini tubos e congeladas em temperatura abaixo de -20° C até a sua utilização.

Para cada animal foram descongeladas 16 palhetas, sendo uma para a avaliação computadorizada (cinética) e os testes de integridade de membrana e capacitação, duas para o teste de lipoperoxidação (TBARS) e uma para a avaliação da geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Todas as análises citadas foram feitas nos quatro grupos experimentais estudados.

Após a homogeneização as amostras foram avaliadas sobre os diferentes parâmetros estudados.

5.3.5 Avaliação computadorizada da cinética espermática

Uma alíquota de 60µL das amostras de cada grupo (13,2 x 10^6 sptz) foi diluída em 250µL de X-Cell® mantido a 37°C e em seguida submetido a avaliação computadorizada da motilidade (Hamilton Thorn Biosciences versão IVOS 12,3, Sperm Analysis System), em câmara de Makler aquecida a 37°C, utilizando a configuração de *setup* conforme recomendado pelo fabricante para carneiros (Anexo 1-10.6). Para cada amostra foram avaliados três campos escolhidos aleatoriamente e automaticamente para os parâmetros de cinética espermática:

- Motilidade Total (MT, %)
- Motilidade Progressiva (MP, %)
- Velocidade de Trajeto (VAP, %)
- Velocidade Curvilinear (VCL, %)
- Velocidade Progressiva (VSL, %)
- Amplitude Lateral da Cabeça (ALH, µm)

- Freqüência de Batimentos de Flagelo (BCF, Hz)
- Retilinearidade (STR, %)
- Linearidade (LIN, %)
- Elongation (ELON, %)
- Espermatozóides com Movimento Rápido (RAP, %)
- Espermatozóides Estáticos (STATIC, %)

5.3.6 Avaliação da integridade de membrana

A avaliação da integridade de membrana foi avaliada pela associação das sondas fluorescentes Iodeto de Propídeo (IP) e Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) (Anexo 1-9.3) (adaptado de HARRISON & VICKERS, 1990). Para isso, 20µL de amostra de cada grupo foram colocados em um tubo protegido da luz e logo após adicionou-se 40µL da Solução de Trabalho (Anexo 1-9.3). Após a homogeneização as amostras foram incubadas por 15 minutos e logo após uma gota desta solução foi colocada entre uma lâmina e lamínula e procedeu-se a avaliação em microscópio com iluminação epifluorescente no aumento de 400 vezes utilizando filtro I3 (Filtro de Excitação e Supressão: BP 450-490/LP515), onde para cada lâmina 100 células foram avaliadas.

As células apresentando a coloração verde são consideradas com a membrana plasmática íntegra, as em vermelho lesadas e as com fluorescência em vermelho e verde com a membrana plasmática lesada e a membrana acrossomal íntegra (HARRISON & VICKERS, 1990) (figura 2).

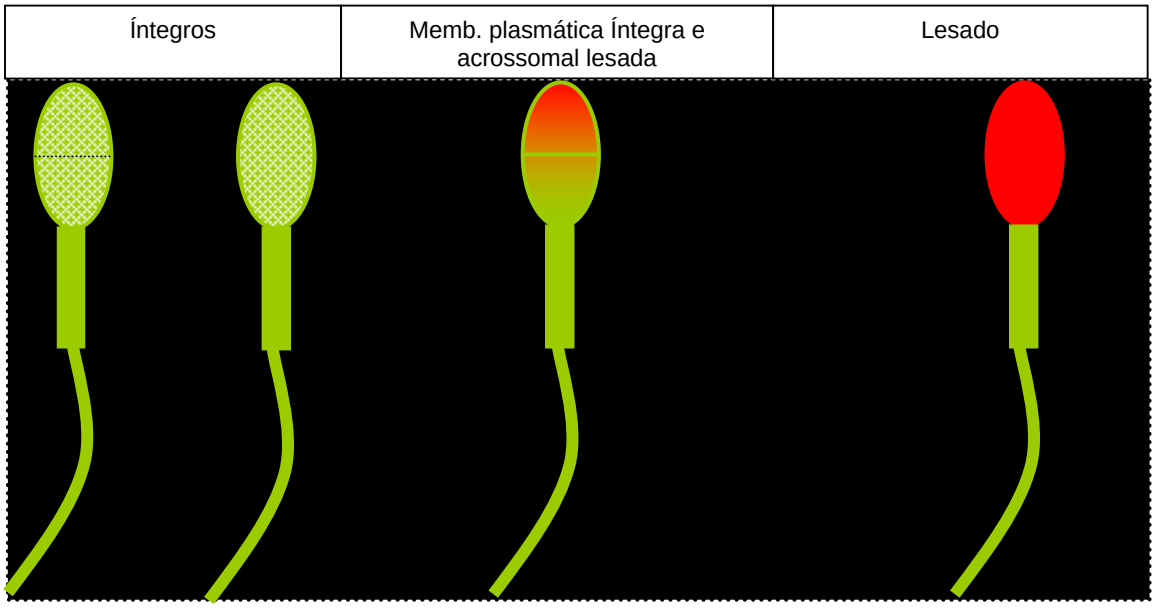


Figura 2. Esquema de visualização e interpretação das categorias para análise da integridade de membrana.

5.3.7 Capacitação espermática e reação acrossomal

As amostras foram testadas quando ao estadio de capacitação com o uso da técnica da Clortetraciclina (CTC) a qual identifica mudanças espermáticas semelhantes a capacitação e reação acrossomal.

De cada amostra, 40 µL foram diluídos em 1000 µL de PBS pré-aquecido a 37°C e submetidas a uma centrifugação a 800xg por 4 minutos (centrífuga Excelsa Baby II – modelo 206R -FANEN). Após a retirada do sobrenadante, o pellet restante foi re-suspendido com 200µL de PBS aquecido contendo em cada frasco os tratamentos utilizados (catalase, Trolox, plasma seminal ou só PBS no caso do grupo controle) e uma alíquota de 10µL dessa mistura foi transferida para tubos contendo 10µL da solução de 1mM de CTC (Anexo 1-9.4) preparada diariamente. A mistura foi então homogeneizada por 20 segundos. Uma gota desta suspensão foi colocada em uma lâmina aquecida e sobre esta uma outra gota de solução com 0,22M de DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano) com o intuito de retardar a perda da fluorescência. A mistura foi então coberta com uma lamínula, comprimida firmemente com papel absorvente, selada com esmalte incolor e mantida, por no máximo 1 hora, protegida da luz a 4°C para leitura (GILLAN et al., 1997; AZEVEDO, 2006).

A contagem dos espermatozóides, 100 para cada lâmina, foi feita sob óleo de imersão em microscópio com iluminação epifluorescente, com aumento de 1000 vezes, utilizando filtro I3 (Filtro de Excitação e Supressão: BP 450-490/LP515).

A classificação foi feita de acordo com a metodologia de Gillan et al. (1997):

- Padrão F: uniforme distribuição da fluorescência por toda a cabeça com presença ou não de faixa pontilhada, mais brilhante, na região equatorial – células intactas
- Padrão B: fluorescência na região anterior da cabeça, ausência de fluorescência na região pós-acrossomal – células com padrão semelhante a capacitação com acrossomo intacto
- Padrão AR: região anterior da cabeça com pouca ou nenhuma fluorescência – células com acrossomo reagido (figura 3)

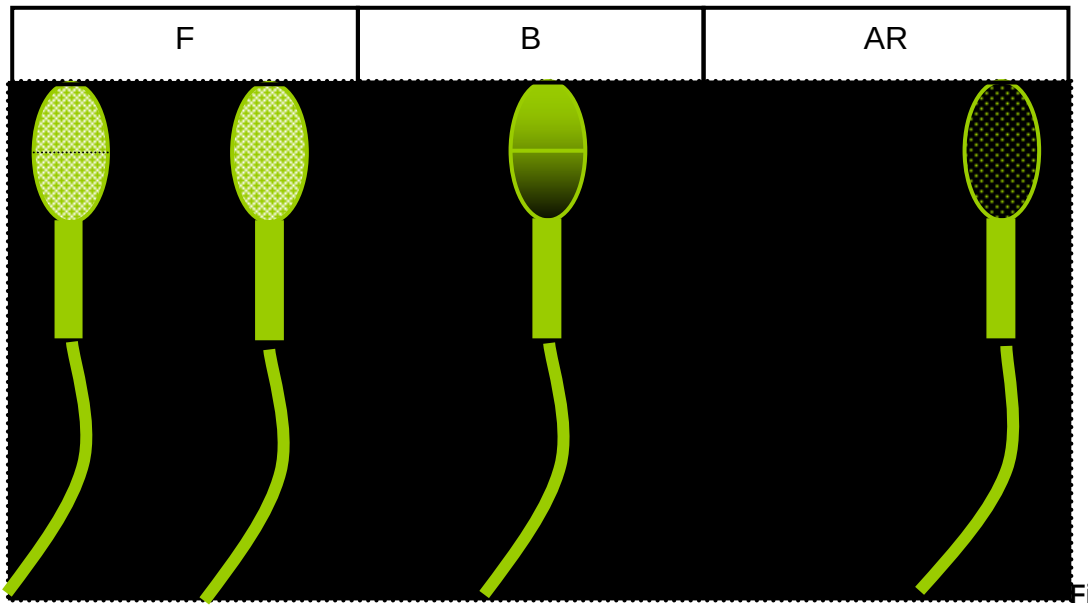


Figura 3. Esquema das características visuais e de interpretação das categorias espermáticas observadas na avaliação da capacitação pelo CTC baseado em Gillan et al. (1997).

5.3.8 Quantificação da lipoperoxidação

A peroxidação dos lipídios da membrana plasmática dos espermatozóides foi determinada pelo método espectofotométrico dos TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), descrito por Buege & Aust (1978), o qual se baseia 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. Todas as análises foram realizadas em espectofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer - Lambda 25) a 25°C.

Para a determinação dos níveis de lipoperoxidação no sêmen criopreservado, foram descongeladas duas palhetas de sêmen de cada carneiro e cada tratamento (figura 4). A dosagem da concentração de TBARS na amostra de sêmen foi determinada da seguinte maneira:

1. Em um tubo falcon depositou-se 0,4 mL da amostra (sêmen: uma palheta com volume aproximado de 200 µl + 200µL de PBS somado ou não aos tratamentos conforme descrito no item 5.3.4), cada tratamento permaneceu em contato com o sêmen por 5 minutos.
2. Em seguida foi adicionado 2mL do reagente TBA (15% de ácido tricloroacético; 0,25M de ácido clorídrico e 0,375% de ácido tiobarbitúrico) e 15µl de BHT 50mM usado para evitar a auto-oxidação dos lipídios, catalisada por íons de metal, durante o aquecimento (LAPENNA et al., 2001) com o reagente tiobarbitúrico (Anexo 1-9.5).
3. Os tubos contendo esta mistura foram incubados em banho fervente por 15 minutos e em seguida, resfriados em um recipiente com gelo triturado.

4. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 1300xg por 15 minutos (centrífuga Excelsa Baby II – modelo 206R -FANEN) e o sobrenadante mantido em banho de gelo e utilizado para a análise espectrofotométrica.

O ensaio foi realizado em duplicata e a absorbância da amostra foi determinada a 532nm contra um branco composto por 1mL de reagente TBA.

Na segunda amostra (0,4 mL de sêmen + tampão PBS) foi adicionado 100µl de sulfato ferroso heptahidratado (2,4mM) para induzir a lipoperoxidação (Anexo 1-9.5) e as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, adicionou-se a cada amostra 2mL do reagente TBA e 30 µl de BHT e foi seguido o protocolo igual para a mensuração de TBARS nas amostras. Este segundo procedimento denominado lipoperoxidação induzida ou catalisada por ferro (LC), tem como objetivo medir todo o potencial que a amostra teria em gerar o radical em questão, sendo considerado o controle positivo da reação ou sistema gerador (SG).

A dosagem da concentração de TBARS foi determinada também no diluente livre de espermatozóide. As amostras dos meios I e II foram descongeladas e misturadas na proporção de 1:2 respectivamente e uma alíquota de 1 mL, para cada amostra, foi utilizada para a determinação da lipoperoxidação em 8 amostras da mesma mistura analisadas de forma pareada, seguindo o mesmo protocolo utilizado para a amostra de sêmen, tanto para a lipoperoxidação espontânea, quanto para a catalisada. O mesmo processo foi repetido para o plasma seminal diluído em PBS.

Para o cálculo das concentrações de TBARS geradas nas amostras, e nos sistema geradores os resultados obtidos foram comparados com uma curva de calibração com malonaldeído (MDA) como padrão, nas concentrações de 1 a 20mmol:

- Foi preparada uma solução estoque de MDA 10mM pela hidrólise de 17mL de *malonaldehyde bis* (dimetil acetal) 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.

5.3.9 Quantificação 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 1-9.6). 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 (MAIA, 2006).

Para a dosagem da quantidade de H_2O_2 liberada pelos espermatozóides, procedeu-se da seguinte forma:

- Uma amostra de 200 μL de sêmen ($100x10_6$ espermatozóides) + 200 μl de PBS contendo ou não os tratamentos foi colocada em tubo e mantida a 37°C.
- Ao sêmen foi acrescentado 975μl da solução tampão para *Phenol Red* (PRS) (Anexo 1-9.6) (figura 4).
- Em seguida 10μL da solução estoque de *Phenol Red* e 15μL da solução de peroxidase (Anexo 1-9.6).
- A amostra foi incubada a 37°C por 30 minutos e em seguida, centrifugada (centrífuga Excelsa Baby II – modelo 206R -FANEN) a 1300xg 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 a 1N. As análises foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS, com duplo feixe (Lambda 25 – Perkin Elmer), cujo compartimento da cubeta foi mantido a 25°C. Utilizou-se cubetas de 1cm de caminho ótico com capacidade para 0,7mL.

Em 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 (SG) e tem o mesmo objetivo do sistema gerador da lipoperoxidação.

Os mesmos procedimentos foram feitos tanto para as amostras de sêmen quanto para o meio diluidor e para o plasma seminal.

O teste foi padronizado com concentrações conhecidas de H_2O_2, obtidas de uma solução cuja concentração era conhecida. Para isso, foi elaborada 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% em 100mL de água destilada (ultra pura), 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 $E = 81 M^{-1} cm^{-1}$, o que gerou uma concentração de 9,4 mmol.
- A solução foi armazenada em geladeira, em frasco de vidro âmbar, envolto com papel alumínio, até a utilização. Foram acrescentados volumes diversos da solução estoque de H_2O_2, de modo a obter as concentrações finais de 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 μmol de H_2O_2, mais o tampão PRS (também em volumes de acordo com a concentração de H_2O_2), 15 µl de peroxidase e 10 µl de solução estoque de *Phenol Red.*
- 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.



Figura 4: painel de fotos do processo de análise de TBARS e de geração de H_2O_2. A- descongelação do sêmen; B- adição da solução TBA; C e D – adição do Fe no sistema gerador; E- preparação dos tubos para incubação; F- incubação em banho fervente; G – centrifugação das amostras; H- cubeta utilização para análise no espectofotometro; I – espectofotometro; J- reagentes para análise do H_2O_2; K- centrifugação das amostras; L- amostras antes (amarelo) e após a adição de NaOH 1N (púrpura); M- homogeinização das amostras antes da leitura; N- grupo de amostras prontas para análise.

5.4 Análise Estatística

As análises foram feitas em um delineamento de blocos ao acaso, levando-se em conta os blocos (carneiros) e três tratamentos (catalase, plasma seminal e Trolox) e o controle. O efeito dos tratamentos sobre os parâmetros da motilidade espermática, integridade de membrana, lipoperoxidadação, geração de peróxido de hidrogênio e capacitação espermática foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias pelo teste de Duncan onde $P<0,05$ (Statigraf analise system®).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação Computadorizada da Cinética Espermática

Pelo método ANOVA de análise dos resultados em relação à motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e demais parâmetros da cinética espermática analisados pelo CASA (VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, STR, LIN, ELON, RAP e STATIC), não houve diferença estatística em relação aos tratamentos utilizados, quando comparado ao grupo controle (P>0,05) (Tabela 1).

As médias e o erro padrão obtidas para cinética espermática nos diferentes tratamentos avaliados estão descritos na Tabela 2.

Vale ressaltar que o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a adição de plasma seminal e antioxidantes após a congelação e descongelação do sêmen ovino independente da característica de crioresistência individual inerente a cada animal. Ao excluírem-se os valores obtidos com carneiros que apresentaram índices abaixo do mínimo recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, obtem-se uma média no grupo controle (CO) de 43,3% para motilidade total e 24,54% de motilidade progressiva. No grupo CAT: 42% para MT e 22,1% para MP; no grupo PS: MT = 45,5% e MP = 25,8% e no grupo TRO: MT = 35% e MP = 21,3%. Do grupo dos 13 carneiros utilizados, dois animais apresentaram valores inferiores ao mínimo para uma amostra congelada e descongelada, que deve ser de no mínimo 30% de espermatozóides móveis após a criopreservação. Uma vez ser comum encontrar no mercado partidas de sêmen ovino apresentando padrões abaixo do recomendado, objetivou-se a avaliação da adição dos tratamentos independente de características individuais. Entretanto os resultados não foram estatisticamente diferentes independente do tratamento avaliado.

Tabela 1 – Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA) no sêmen ovino congelado/descongelado frente aos tratamentos CAT (catalase), CO (controle), PS (plasma seminal) e TRO (trolox).

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	Valor de P
MT (%)	Blocos	12	576,27244	3,882	0,0008
	Tratamento	3	140,58974	0,947	0,4282
	Resíduo	36	148,46474		
MP (%)	Blocos	12	205,07692	3,369	0,0023
	Tratamento	3	12,01923	0,197	0,8975
	Resíduo	36	60,880342		
VAP (µm/s)	Blocos	12	1807,1855	11,165	0,0000
	Tratamento	3	283,4682	1,751	0,1740
	Resíduo	36	161,86612		
VCL (µm/s)	Blocos	12	1281,6052	8,707	0,0000
	Tratamento	3	292,1221	1,985	0,1337
	Resíduos	36	147,18455		
VSL (µm/s)	Blocos	12	2122,3713	11,198	0,0000
	Tratamento	3	382,4436	2,018	0,1288
	Resíduos	36	189,52956		
ALH (µm/s)	Blocos	12	1,7785577	10,225	0,0000
	Tratamento	3	0,0535256	0,308	0,8196
	Resíduos	36	0,1739423		
BCF (Hz)	Blocos	12	8,2497743	1,319	0,2517
	Tratamento	3	0,1068750	0,017	0,9969
	Resíduos	36	6,2523393		
STR (%)	Blocos	12	97,599359	7,263	0,0000
	Tratamento	3	29,256410	2,177	0,1076
	Resíduos	36	13,436966		
LIN (%)	Blocos	12	263,27564	11,129	0,0000
	Tratamento	3	31,71154	1,341	0,2765
	Resíduos	36	23,655983		

Continuação Tabela 1 - Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA) no sêmen ovino congelado/descongelado frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox).

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	Valor de P
ELON (%)	Blocos	12	32,195157	0,669	0,7680
	Tratamentos	3	25,240028	0,525	0,6681
	Resíduos	36	48,098474		
RAP (%)	Blocos	12	430,44142	4,515	0,0002
	Tratamentos	3	23,60114	0,248	0,8625
	Resíduos	36	95,334188		
STATIC (%)	Blocos	12	749,36396	4,154	0,0005
	Tratamentos	3	103,91738	0,576	0,6346
	Resíduos	36	180,39756		

Tabela 2 - Médias ± erro padrão dos parâmetros de cinética espermática, pelo sistema de análise computadorizada (CASA) no sêmen ovino congelado/descongelado frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox).

PARÂMETRO	TRATAMENTO			
	CO	CAT	PS	TRO
MT (%)	39,9 ± 3,79	42,1 ± 5,22	43,5 ± 4,89	36,0 ± 3,59
MP (%)	22,7 ± 2,18	22,1 ± 2,67	24,1 ± 3,28	22,0 ± 2,67
VAP (µm/s)	126,8 ± 7,20	118,1 ± 5,14	117,6 ± 7,67	125,0 ± 6,25
VCL (µm/s)	184,0 ± 6,25	173,4 ± 4,33	175,0 ± 6,22	179,2 ± 5,98
VSL (µm/s)	110,1 ± 8,09	101,0 ± 5,78	100,3 ± 8,04	110,0 ± 6,58
ALH (µm/s)	6,4 ± 0,21	6,4 ± 0,22	6,3 ± 0,20	6,3 ± 0,20
BCF (Hz)	39,1 ± 0,89	39,3 ± 0,72	39,2 ± 0,62	39,3 ± 0,66
STR (%)	79,1 ± 1,72	77,1 ± 1,56	77,6 ± 1,87	80,5 ± 1,29
LIN (%)	56,0 ± 2,70	54,0 ± 2,20	54,0 ± 2,89	57,0 ± 2,26
ELON (%)	37,5 ± 2,01	38,4 ± 2,19	37,1 ± 1,46	40,3 ± 1,68
RAP (%)	28,4 ± 3,11	28,2 ± 3,71	30,4 ± 4,43	27,1 ± 3,35
STATIC (%)	53,0 ± 4,35	48,0 ± 6,03	49,1 ± 5,05	53,7 ± 4,14

Maxwell et al. (1999), obtiveram resultados estatisticamente superiores quanto a motilidade após a adição de 20% de plasma seminal (PS) diluído em PBS ao sêmen ovino congelado e descongelado (52% vs 75%). Neste mesmo estudo, testou-se a adição do plasma seminal de 3 carneiros, individualmente, e um *pool* dos mesmos 3 animais. Houve diferença estatística também entre os machos, indicando a possibilidade de haver uma variabilidade individual na composição do PS o que influenciará o resultado. Através da adição desta porcentagem de PS os autores observaram índices satisfatórios de prenhez com o uso da IA cervical (51% vs 28%) com sêmen congelado.

No presente experimento utilizou-se um *pool* de PS de 3 diferentes carneiros, o critério para a utilização destes animais foi o resultado na congelação do sêmen, sendo que todos apresentaram resultados de motilidade pós-congelação superiores a 30%. Porém, os resultados aqui obtidos não corroboram com achados de Maxwell et al. (1999).

Mortimer & Maxwell (2004) avaliaram a cinética espermática após a adição de 20% de PS ao sêmen congelado e descongelado, contudo a adição foi feita em uma solução tampão para *swim-up*, ou seja, as análises foram realizadas com sub populações de espermatozóides funcionalmente melhores. Da mesma forma bons resultados foram obtidos nos grupos sem a adição de PS, contendo apenas a solução tampão. A retirada do meio diluidor, do crioprotetor e re-suspenção dos espermatozóides em um meio tamponante poderia por si só ter sido suficiente para melhorar a cinética espermática.

Pena et al. (2003) utilizando 100 e 200µMol x 500 x 10^6 sptz de Vitamina E no sêmen de cachaço congelado e descongelado, puderam observar um incremento nos padrões de cinética quando comparado ao grupo controle. O mesmo não pôde ser observado no sêmen de carneiros no presente estudo, corroborando com os dados encontrados por Maia (2006) e por Sicherle et al. (2006), quando se testou a adição de Trolox em diferentes concentrações, no meio diluidor para congelação. De fato Maia (2006), utilizando 50 µMol x 100 x 10^8 sptz de Trolox obteve um valor estatísticamente menor quanto a motilidade total e progressiva quando comparado ao demais grupos contendo catalase e somente no meio diluidor.

A utilização da vitamina E ou de seus análogos é controversa no que diz respeito à cinética espermática, uma vez que alguns autores encontraram resultados satisfatórios em suínos (CEROLINI et al., 2000; PENA et al, 2003), ou não encontraram diferença (UPRETI et al, 1997; SICHERLE et al., 2006) e outros obtiveram resultados negativos (MAIA, 2006).

Sicherle et al. (2006) utilizando concentrações de 50, 100, 150 e 200 µM de Trolox adicionados ao meio diluidor antes da congelação do sêmen ovino, observaram que as concentrações iguais ou maiores que 150 µM foram deletérias a motilidade progressiva dos espermatozóides. O fato da vitamina E penetrar rapidamente dentro da célula, mas sua retirada ser lenta (WU et al., 1990; Doba et al., 1985) pode ser a explicação para a sua aparente toxicidade quando utilizada em doses mais altas.

De qualquer forma a intenção da utilização dos antioxidantes bem como do PS não teve o intuito de otimização dos padrões de cinética espermática e sim de primeiramente controlar a geração de radicais que além de outros danos levam a peroxidação dos lipídeos da membrana. Com isso um efeito secundário nos padrões de motilidade do espermatozóide poderia ter ocorrido, uma vez que, uma alta geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) influencia diretamente a motilidade (AITKEN et al., 1993). Este efeito poderia ter sido encontrado com a adição de 12,5 mg/mL de catalase, o que não ocorreu no presente estudo.

Maia em 2006, com a utilização de 6,25 mg/mL (0,0935 U/mL) de catalase adicionado ao meio diluidor, não obteve índices diferentes do grupo controle quanto a MT e MP. No sêmen ovino sexado Graaf et al. (2006), também não observaram efeito da adição de 100 U/mL de catalase ao meio diluidor sobre os mesmos parâmetros. Já no sêmen refrigerado a 5°C, Maxwell & Stojanov (1996), observaram que 100 ou 200 U/mL de catalase foi capaz de manter melhores taxas de motilidade durante 6 dias quando comparado ao grupo controle. Provavelmente neste experimento a catalase anulou os efeitos deletérios que a produção de H_2O_2 teria sobre a célula durante este período, contudo Upretti et al. (1997) não observou o mesmo efeito na adição de 45µg/mL no sêmen incubado a 37°C por 3 dias.

6.2 Integridade de Membrana

De acordo com a análise ANOVA, não houve diferença estatística (P>0,05) entre os tratamentos quanto a avaliação da integridade de membrana avaliada pelo método de fluorescência utilizando a combinação de sondas Iodeto de Propídeo (IP) e Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC) (Tabela 3 e 4).

Tabela 3 - Resumo da análise de variância dos parâmetros da avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal pelo método de fluorescência (IP e DIC) no sêmen ovino congelado/descongelado frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox) – IM1: membrana plasmática e acrossomal íntegras; IM2: membrana plasmática danificada e membrana acrossomal íntegra; IM3 membranas plasmática e acrossomal danificadas.

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	Valo de P
IM1	Blocos	12	45,118590	0,576	0,8468
	Tratamento	3	37,589744	0,480	0,6984
	Resíduos	36			
IM2	Blocos	12	260,34936	3,452	0,0019
	Tratamento	3	123,50641	1,638	0,1978
	Resíduos	36			
IM3	Blocos	12	359,23397	2,084	0,0443
	Tratamento	3	158,07692	0,917	0,4423
	Resíduos	36			

Tabela 4 - Médias ± erro padrão dos parâmetros de integridade de membrana plasmática e acrossomal pelo método de fluorescência (IP e DIC) no sêmen ovino congelado/descongelado frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox).

	TRATAMENTO			
PARÂMETRO	CO	CAT	PS	TRO
IM1	13,0 ± 1,92	15,5 ± 2,18	13,3 ± 2,03	16,5 ± 3,00
IM2	35,0 ± 2,61	38,5 ± 2,96	42,4 ± 2,76	39,0 ± 3,76
IM3	52,2 ± 2,49	46,0 ± 4,31	46,0 ± 3,79	44,4 ± 5,30

Ao avaliar-se os resultados do grupo controle percebe-se que a média encontrada para células integras foi baixo em comparação com outros dados de literatura para integridade de membrana do sêmen ovino congelado e descongelado. Apesar de Harrison & Vickers (1990) classificarem as células coradas com IP na cabeça e com retenção de DIC na região do acrossomo como espermatozóides com a membrana plasmática lesada e acrossomal intacta, para quantificação final das células neste estudo por eles desenvolvido, todas as células coradas em vermelho (IP), em qualquer parte, foram classificadas como lesadas. Esta classificação leva em consideração o fato da necessidade da membrana plasmática estar intacta para que o espermatozóide esteja móvel e, portanto em condições de realizar a fertilização (HARRISON & VICKERS, 1990; RODRIGUEZ-MARTINEZ & BARTH, 2006). Os resultados obtidos no presente experimento ocorreram desta forma talvez por características de crioresistência, uma vez que todos machos eram da mesma linhagem genética (AZEVEDO, 2007).

A adição de catalase (6,25 mg/mL) foi benéfica na preservação da integridade de membrana plasmática e acrossomal, analisada por Maia em 2006 através da combinação de sondas fluorescentes 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). O mesmo resultado, porém em menor proporção foi observado no mesmo estudo com a adição do Trolox (Catalase = 34,1%; Trolox = 31% vs Diluidor = 29%), sendo todos adicionados ao meio diluidor previamente a congelação do sêmen, o que neste caso pode ter sido mais eficiente em proteger a célula antes que a lesão ocorra.

Ollero et al., (1996) também observaram um maior número de células intactas, no sêmen ovino congelado e descongelado, no grupo adicionado de vitamina E.

Quanto à utilização do plasma seminal, estudos onde se adicionou ao sêmen apenas frações proteicas demonstram melhores resultados na preservação e até mesmo na recuperação da membrana plasmática (OLLERO et al., 1997; BARRIOS et al. 2000; BARRIOS et al. 2005). No presente estudo a adição do PS não resultou em alterações significativas quanto à integridade de membrana quando comparado aos demais grupos.

O perfil protéico do PS não foi o objetivo do presente estudo, mas talvez as outras substâncias contidas no PS, que não as determinadas frações protéicas, anulem o efeito “protetor” de membrana conferido por elas, uma vez que a fisiologia normal da célula seria o de realizar a capacitação (desestabilização e posterior fusão das membranas celulares) para que ocorra a fertilização oócito. Um aspecto interessante é refletir sobre as células que nestes estudos demonstram uma “recuperação” da membrana plasmática. Como estaria o DNA celular? Uma vez que a membrana plasmática se tornou permeável, pode ter ocorrido dano ao DNA, portanto, a recuperação da membrana seria suficiente para recuperar o potencial fertilizante deste espermatozóide? Segundo Peris et al. (2006) em estudo com sêmen ovino, há uma aumento na porcentagem de células com fragmentação do DNA celular após a criopreservação.

Conforme o delineamento deste experimento, a utilização dos antioxidantes e do PS foram feitas após a congelação e descongelação das amostras, de modo que, as alterações causadas pela criopreservação, como a alteração na permeabilidade da membrana foram de tal magnitude que se tornou irreversível.

6.3 Capacitação Espermática

O padrão de classificação para capacitação espermática proposto por Gillan et al. (1997), utilizando a sonda fluorescente Clortetraciclina, foi utilizado neste experimento onde padrões de coloração foram diferenciados e ordenados como descrito no item 5.3.7.

Pela análise ANOVA não houve diferença estatística entre os tratamentos ($P>0,05$) (Tabela 5). Os resultados obtidos no grupo controle são parecidos com os encontrados na literatura para o sêmen ovino pós congelação (F= 13,5%; B= 32,3%; AR= 54,1%). Os dados obtidos por Gillan et al. (1997) foram: F= 8%; B= 65% e AR= 27%. Já Azevedo (2006), encontrou 14,9% de padrão F, 34,0% para o padrão B e 51,1% de células com padrão AR. Estes dados confirmam que sêmen ovino apresenta a maior parte dos espermatozóides com alterações semelhantes a capacitação, após ter passado pelo processo de criopreservação. Segundo Pérez et al. (1996) mesmo a célula aparentemente intacta apresenta uma modificação semelhante à capacitação mais acelerada quando testada frente a

uma capacitação induzida. Isso nos leva a crer que as alterações estruturais da membrana são induzidas pela criopreservação, mesmo que a célula pareça intacta.

A adição de 20% plasma seminal de 3 diferentes carneiros, separadamente, apresentou-se de maneira diferente quanto aos padrões de CTC, em trabalho desenvolvido por Maxwell et al. em 1999. Comparado ao grupo controle (F= 30%; B= 41% e AR=25%) o grupo em que utilizou-se o PS do animal "C" foi estatisticamente mais efetivo do que os demais machos testados (**A:** F=30%; B=38%; AR=22%; **B:** F=31%; B=42%; AR=22%; **C:** F=35%; B=42%; AR=15%), quer dizer há variação entre os animais quanto aos componentes contidos no PS. Contudo, a adição de PS a uma solução tamponante para *swim-up* não apresentou melhores resultados quando comparado à solução de PBS sozinha ou a uma outra solução denominada plasma seminal artificial (ASP), desenvolvida por O`Donnell (1969) composta por sais e frutose. Deve-se levar em conta que a técnica de *swim-up* recupera uma população de células morfologicamente melhores e neste caso a solução ASP recuperou uma maior quantidade de espermatozóides de padrão F (**ASP:** F=58%; **PBS:** F=42%; **PS+PBS:** F=38%) (MORTIMER & MAXWELL, 2004).

A adição dos tratamentos após a criopreservação, mesmo após a centrifugação e re-suspenção em soluções contendo os tratamentos (metodologia para a análise de CTC) no presente estudo, não foi estatisticamente diferente. Como hipótese as modificações ocorridas durante o processo de congelação e descongelação, nas condições experimentais, não foram reversíveis.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância dos parâmetros de capacitação espermática (CTC), no sêmen ovino frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox), tendo como variação os blocos e os tratamentos.

Padrão	Causas de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	Valo de p
F (%)	Blocos	12	41,39	0,580	0,8436
	Tratamento	3	17,71	0,248	0,8621
	Resíduos	36	71,71		
B (%)	Blocos	12	275,00	2,911	0,0065
	Tratamento	3	221,14	2,341	0,0896
	Resíduos	36	94,48		
AR (%)	Blocos	12	456,27	3,08	0,0044

Tratamento	3	36,74	0,25	0,8620
Resíduos	36	147,96		

Tabela 6 - Médias ± erro padrão dos parâmetros de capacitação espermática pelo método de fluorescência através do CTC: padrão F: espermatozóides não capacitados; padrão B: alterações semelhantes a capacitação; padrão AR: espermatozóides com acrossomo reagido, no sêmen ovino frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox).

	TRATAMENTO			
PADRÃO	CO	CAT	PS	TRO
F (%)	13,5 ± 1,91	14,3 ± 2,02	11,5 ± 2,00	13,4 ± 2,81
B (%)	32,4 ± 3,10	34,0 ± 3,70	42,0 ± 3,26	36,2 ± 2,98
AR (%)	54,1 ± 3,14	52,0 ± 4,86	51,3 ± 4,09	50,1 ± 4,33



Figura 5. Visualização dos padrões da análise da capacitação –CTC. **A e B**- padrão F; **C**- padrão B; **D**- padrão AR; **E**- microscópio de fluorescência.

6.4 Lipoperoxidação e Geração de H_2O_2

Pela análise ANOVA houve diferença estatística entre os tratamentos tanto para a geração de TBARS (nas amostras (sêmen) e no sistema gerador adicionado de +$FeSO_4$), quanto para a geração de H_2O_2 (somente nas amostras) (Tabela 7).

A geração de TBARS, lipoperoxidação, no grupo controle demonstrou o que ocorre com a peroxidação dos lipídeos após a congelação e descongelação do sêmen ovino sem a interferência de aditivos. A geração de 1,2 nmol de TBARS/10^8 sptz não foi diferente da encontrada por Maia em 2006, utilizando a mesma metodologia (1,26 nmol de TBARS/10^8 sptz). A metodologia empregada é de fundamental importância para comparação da lipoperoxidação, uma vez que a concentração de células na amostra influencia diretamente os níveis de peroxidação dos lipídeos. Outro aspecto a ser relevado é a adição de BHT, que foi utilizado na técnica de TBARS deste experimento, por causa da auto-oxidação sofrida pelos lipídeos das amostras, reação esta catalisada por íons metal durante o aquecimento com o ácido tiobarbitúrico como parte da metodologia. Esta reação pode ser evitada pela adição de BHT (BUEGE & AUST, 1978). O método TBA também favorece a liberação de percussores de TBARS a partir da oxidação das proteínas gerando mais TBARS. La Penna et al. (2001) utilizaram o BHT no meio reacional com a intenção de minimizar esta reação.

A adição do plasma seminal aumentou ($P<0,05$) a produção de TBARS em relação aos demais tratamentos tanto na lipoperoxidação espontânea (LE) quanto na catalisada (LC) (Tabela 7 e 8), provavelmente este fato se deve aos lipídeos (fosfolipídios e colesterol) e as proteínas contidos no PS, uma vez que as amostras contendo apenas o PS em PBS também produziram valores altos de TBARS (3,4 nmol/mL) (Tabela 10).

Tabela 7 - Resumo da análise de variância dos parâmetros da geração de peróxido de hidrogênio H_2O_2 e lipoperoxidação (TBARS) no sêmen ovino, na presença ou não de um catalisador químico da geração de H_2O_2 e da lipoperoxidação, tendo como causa de variação os tratamentos (catalase, controle, plasma seminal e trolox) e os blocos (carneiros).

Parâmetro	Causas de Variação	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F	Valor de p
TBARS (amostra)	Blocos	12	6,494	11,188	0,0000
	Tratamento	3	7,467	12,864	0,0000
	Resíduo	88	0,580		
TBARS (+$FeSO_4$)	Blocos	12	4,721	5,238	0,0000
	Tratamento	3	12,975	14,397	0,0000
	Resíduo	88	0,901		
H_2O_2 (amostra)	Blocos	12	572,0	4,321	0,0000
	Tratamento	3	695,3	5,252	0,0022
	Resíduo	88	132,4		
H_2O_2 (+H_2O_2 10mM)	Blocos	12	1749,6	5,80	0,0000
	Tratamento	3	400,48	1,33	0,2704
	Resíduos	88	301,56		

No sêmen humano congelado sem PS a adição de 60% de PS em solução tampão após a descongelação produziu menores índices de lipoperoxidação (0,198 nmol de TBARS/10^6) quando comparado ao grupo controle e ao grupo com a adição de 20% de PS (0,402 e 0,344 nmol de TBARS/10^6 respectivamente) (POTTS et al., 2000).

Jones & Mann (1977b), adicionaram gema de ovo, PS filtrado de bovinos, humanos, garanhão e carneiro ao espermatozóide ovino fresco sem a presença do PS e obtiveram 49, 10, 120, 132 e 122 nmol de TBARS/10^9 incubado com a adição de FeSO4 e ascorbato. O PS de bovinos foi o mais efetivo em proteger as células da peroxidação dos lipídeos. Os índices obtidos, no presente estudo, na lipoperoxidação catalisada (LC) foram bem menores em todos os grupos (Tabela 8), provavelmente pela adição do BHT que não foi mencionado no estudo destes autores.

Tabela 8 - Médias ± erro padrão das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), geradas no sêmen ovino durante a lipoperoxidação espontânea (LE) ou catalisada por 0,24 mmol de $FeSO_4$-$7H_2O$ (LC) frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox). Resultados expressos em nmol de TBARS/10^8 espermatozóides.

TBARS (nmol/10^8 sptz)		
Tratamento	Sêmen (LE)	Sêmen **+** +$FeSO_4$ (LC)
CO	$1,2 \pm 0,18^b$	$2,3 \pm 0,24^B$
CAT	$1,2 \pm 0,25^b$	$2,5 \pm 0,28^B$
PS	$2,3 \pm 0,25^a$	$3,3 \pm 0,18^A$
TRO	$1,4 \pm 0,20^b$	$1,6 \pm 0,18^C$

- Letras minúsculas comparam médias na mesma coluna
- Letras maiúsculas comparam médias na mesma coluna
- Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente

A adição do Trolox e da catalase não foram diferentes do controle durante a lipoperoxidação espontânea (LE) corroborando com os relatos de Maia (2006) que também não encontrou diferença entre os tratamento com a adição de 6,25 mg/mL de catalase ou de 50 µMol x 100 x 10^6 sptz de Trolox ao meio diluidor antes da criopreservação do sêmen, supondo que para efeito da lipoperoxidação, seria indiferente adicionar o antioxidante antes ou após a congelação e descongelação.

Já na lipoperoxidação catalisada por ferro (sistema gerador) a adição do Trolox foi benéfica. Produziu menos nmols de TBARS/10^8 sptz quando comparado aos demais grupos. O mesmo pôde ser observado por Maia (2006) no sêmen congelado de ovinos e por Cerolini et al. (2000) com a adição de vitamina E no sêmen de cachaços incubado por 5 dias. Pode-se concluir que o Trolox age da forma esperada frente a uma situação de estresse oxidativo inibindo a reação formadora de hidroperóxidos (LIEBLER, 1993).

O mesmo não pôde ser observado ao avaliar-se os índices de TBARS produzidos somente no diluidor, tanto nas amostras quanto nos sistema geradores, 3,0 e 3,2 nmol/mL respectivamente (tabela 10), valores estes bem mais altos do que nas análises contendo o sêmen. Podemos analisar estes dados por dois lados: por um lado, nas análises contendo o sêmen, podemos concluir que o espermatozóide também interagiu com o meio onde estava, pois nestas

amostras a geração de TBARS foi menor, talvez pela ação das substâncias contidas no PS do próprio doador; por outro lado o meio diluidor pode não ter contribuído para a ação dos antioxidantes que se desgastaram ao reagirem com as ROS produzidas pelo diluidor, através das substâncias nele contidas, como os lipídeos da gema de ovo e a frutose.

Tabela 9 - Médias ± erro padrão das concentrações de peróxido de hidrogênio gerado no sêmen ovino e no sêmen ovino na presença de H_2O_2 exógeno (100 nmol/mL) adicionado ao meio reacional,frente aos tratamentos CO (controle), CAT (catalase), PS (plasma seminal) e TRO (trolox). Resultados expressos em nmol de H_2O_2/100 x 10^6 sptz/ 30 min.

	H_2O_2 (nmol/100 x 10^6 sptz/ 30 min)	
Tratamento	Sêmen	Sêmen **+** H_2O_2
CO	10,2 ± 1,25[b]	36,7 ± 3,86
CAT	10,2 ± 0,67[b]	32,0 ± 3,59
PS	21,1 ± 4,57[a]	36,5 ± 4,03
TRO	13,0 ± 2,35[b]	41,5 ± 5,38

- Letras minúsculas comparam médias na mesma coluna
- Letras maiúsculas comparam médias na mesma coluna
- Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente

Tabela 10 - Médias ± erro padrão das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) geradas no meio diluidor e no plasma seminal em PBS durante a lipoperoxidação espontânea (LE) ou catalisada por 0,24 mmol de $FeSO_4$-$7H_2O$ (LC) e das concentrações de peróxido de hidrogênio gerados no meio diluidor e no plasma seminal em PBS e destes na presença de H_2O_2 exógeno (100 nmol/mL).

	TBARS (nmol/mL)	H_2O_2 (nmol/mL)
Meio diluidor	3,0 ± 0,26	26,4 ± 0,32
Meio diluidor +SG*	3,2 ± 0,23	49,7 ± 1,6
Plasma seminal em PBS	3,4 ± 0,34	1,6 ± 0,16
Plasma seminal em PBS+ SG*	6,4 ± 0,35	37,4 ± 6,2

*Sendo SG (sistema gerador) +$FeSO_4$ para o teste TBARS e o H_2O_2 para o teste do peróxido de hidrogênio

Na análise das concentrações de H_2O_2 observa-se que houve diferença entre os tratamentos (P<0,05), onde a adição de PS gerou mais H_2O_2 do que os

outros grupos (Tabela 9 e 10), devido provavelmente às mesmas razões pelas quais o PS produzido maior índices de TBARS. Segundo De Lamirande & Gagnon (1992) o alvo principal das ROS são os lipídeos, proteínas, açucares e ácidos nucléicos, o que vem ao encontro com grande parte da composição do plasma seminal. Porém quando se analisa a geração de H_2O_2 isoladamente nas amostras de PS em PBS, verifica-se que a alta geração de H_2O_2, observada nos grupos tratamento, não ocorreu neste caso (10,2 nmol/100 x 10^6 sptz/ 30 min no grupo controle e 1,6 nmol/mL no PS em PBS). Já no sistema gerador o PS em PBS gerou 37,4 nmol/mL de H_2O_2. Estes resultados corroboram com os achados de Abu-Erreish et al. (1978) apud Maxwell & Stojanov (1996) em que o sêmen de carneiros possui pouca atividade de catalase. De forma que a geração de H_2O_2 tanto nas amostras quanto no meio diluidor (26,4 nmol/mL) foram superiores a quantidade de catalase contida nestes meios. Além disso, segundo De Lamirande & Gagnon (1999), uma alta produção de ROS leva não somente a lipoperoxidação e dano ao DNA, mas afeta também a produção de ATP e de NAPH, sendo que a ação da catalase também depende da NADPH que se liga a ela, protegendo a enzima da inativação e também potencializa a sua eficiência.

Como sugestão, em situações de maior estresse oxidativo, a adição do antioxidante Trolox ao sêmen ovino congelado e descongelado, nas concentrações experimentais, pode ser indicada, mesmo que o papel destes antioxidantes seja o de anular as ROS produzidas também pelos ingredientes dos meios e soluções.

7. CONCLUSÕES

1- A adição dos antioxidantes catalase e Trolox e de plasma seminal ao sêmen ovino congelado e descongelado, nas concentrações utilizadas, não produzem efeito quanto à cinética e capacitação espermática ou na integridade de membrana.

2- O Trolox foi benéfico quanto à geração de TBARS na lipoperoxidação induzida onde a adição de +FeSO4 gera um estresse oxidativo.

3- A catalase não produziu índices estatisticamente diferentes de geração de TBARS e de H_2O_2 comparados ao controle, tanto nas amostras quanto nos sistema geradores.

4- O plasma seminal aumenta a produção de TBARS e de H_2O_2 quando adicionado ao sêmen após sua congelação e descongelação.

5- O plasma seminal diluído em PBS gera altos índices de TBARS tanto da lipoperoxidação espontânea quanto na catalisada e de H_2O_2 quando desafiado na reação catalisada por a adição de H_2O_2.

6- O meio diluidor utilizado gera altas concentrações de TBARS e de H2O2 tanto nas reações espontâneas quanto nas catalisadas.

8. REFERÊNCIAS

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

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

AITKEN, R.J. The human spermatozoon – a cell in crisis? **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p. 1-7, 1999.

AITKEN, R.J.; Possible redox regulation of sperm motility activation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 491-496, 2000.

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

BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R.; GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRÍAN- PÉREZ. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 63, 1531-537, 2000.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa.** Iowa: Iowa State University Press – AMES, 1989, 285 p.

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.

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, p. 282-288, 2000.

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

CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55 kilo Dalton fertility associated protein in Holstein bull. **Biology of Reproduction**, v57, p1293-301, 1997.

CARDOZO, J.A.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel eletrophoresis. **Theriogenology**, v. 66, p. 841-850, 2006.

CATT, S.L.; O'BRIEN, J.K.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 32, p.251-258, 1997.

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

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.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 10149-155, 1992.

DOBA, T.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous mutilamellar phospholipid lipossomes. **Biochemical et Biophysical Acta**, v. 835, p. 298-303, 1985.

EL-RAJJ GHAOUI, R.; GILLIAN, L.; THOMSON, P.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomised rams on the motility characteristics, membrane status and in vitro fertility of ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 1-44, 2006.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. ed Butterworths, 1987, 194 p.

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.

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA, p. 31-31, 1992.

FOOTE, R.H. Survival of bull sperm in milk and yolk extenders with added catalase. **Journal of Dairy Science**, v. 45, p. 907-910, 1962.

FUKUZAWA, K.; TAKASE, S.; TSUKATANI, H. The effect of concentration on the antioxidant effectiveness of α-tocopherol in lipid peroxidation induced by superoxide free radicals. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 240, p. 117-120, 1985.

GARBER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. (7 ed.) Reprodução Animal, Barueri, São Paulo, Manole,p.97-110.

GARENAM, R.L.; INIKUDA, D.; UNADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of a fertility associated protein in Bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin-D sytetase. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 826-33, 1998.

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

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

GONZALEZ, C.I.M. **Avaliação *in vivo* de sêmen ovino (Ovis áries) congelado em palhetas e *pellets* com diferentes diluidores.** 1996. 135 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

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**, article in press, 2006.

GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v. 20, p. 61-69, 1997.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (Revisão de Literatura), **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n.4, p. 187-195, 2004.

HALLIWELL, B; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Fd Chem. Toxic.**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

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.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R.C. Two-dimentional polyacrylamide gel eletrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v.61, p. 255-266, 2004.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; WALD, V.B; HORN, A.P.; MATTOS, R.C. BSP A1/ A2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 63, p. 2053-2062, 2005.

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

JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-268, 1977b.

JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R.; Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v. 31, p.531-537, 1979.

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.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-Associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, V. 49, p. 1202-207, 1993.

LA FALCI, V.S.N.; TROTORELLA, H.; RODRIGUES, J.L.; BRANDELLI, A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. **Theriogenology**, v. 57, p. 1035-1048, 2002.

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

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

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato e sódio (OEP), Trolox-C e catalase.** 2006. 147 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

MAXWEL, 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. 1013-020, 1996.

MAXWELL,W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometry sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction Fertility and Development**, v. 8, p. 1165-178, 1997.

MAXWELL, W.M.C; 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.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A.; Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 52, p. 1353-362, 1999.

MAXWELL, W.M.C.; GRAAF, S.P.; EL-HAJJ GHAOUI, R.; EVANS, G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. In: 7th International Ruminant Reproduction Symposium, 1, 2006, Wellington. Anais. Wellington, New Zealand, 2006, p.13-38.

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

MORTIMER, S. T.; MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p. 285-291, 2004.

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.

OBA, E.; DELL'AQUA JR, J.A.; SOUZA, D.B.; PAPA, F.O.; BICUDO, S.D.; MACEDO, L.P. Influence of centrifugation and removal of seminal plasma in cryopreservation of ram semen. In: 15th International Congress on Animal Reproduction, 2., 2004, Porto Seguro. Anais Abstract Volume 2. ICAR 2004, p. 481.

O'DONNEL, J.M. Intracellular levels of sodium and potassium in bull spermatozoa in relation to cell metabolism. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.19, p. 207-209, 1969.

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

OLLERO, M.; MUIÑO-BLANCO, T.; LÓPEZ-PÉRES, M.J.; CEBRIAN PÉREZ, J.A. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in n aqueous two-phase system effect of different cryoprotectants. **Journal of Chromatography Biology**, v. 680, p. 157-164.

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.

PERIS, S., I.; BILODEAU, J.F.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and development**, v. 74, n.7, p.878-892, 2007.

PESCH, S.; BERGMANN, M.; BOSTEDT,H. Determination of some enzymes and macro- and micro elements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, v. 66, p. 307-313, 2006.

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

POTTS, R.J.; NOTARIANNI, L.J.; JEFFERIES, T.M. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. **Mutat. Research**, v.447, p.249-256, 2000.

RODELLO, L. **Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino.** 2006, 86 f., Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; BARTH, A.D. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. In: 7th International Ruminant Reproduction Symposium, 1, 2006, Wellington. Anais. Wellington, New Zealand, 2006, p.39-54.

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.; 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.

SICHERLE, C.C.; MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; GREEN, R.E.; SOUZA, D.B.; AZEVEDO, H.C. The effect of Trolox addition to egg yolk-Tris extender on the motility and membrane integrity of frozen-thawed ram spermatozoa. In: 7th International Ruminant Reproduction Symposium, 1, 2006, Wellington. Anais. Wellington, New Zealand, 2006, p.466.

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.

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

WARD, C. R.; STOREY, B.T. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. **Developmental Biology**, v. 104, p. 287-296, 1984.

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.

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

ZINI, A.; FISCHER, M.A.; MAK, V.; PHANG, D.; JARDI, K. Catalase-like and superoxide desmutase-like activities in human seminal plasma. **Urology Research**, v. 30; p. 321-323, 2002.

9. ANEXO 1

9.1 Composição do Meio Diluente Gilcina Gema Leite (GONZALEZ, 1996)

Solução A

Glicina (Botica ao Veado D'ouro)	1,40 g
Citrato de Sódio (Merk KGaA)	2,97 g
Água deionizada e destilada	100 mL

Solução B

Frutose (Sigma)	3,00 g
Água deionizada e destilada	100 mL

Solução Mãe

Solução A	100 mL
Solução B	100 mL
Penicilina G- sódica ou potássica	0,033 g
Dihidroestreptomicina	0,1 g

Solução Filha

Solução mãe	114 mL
Gema de ovo	40 mL
Leite desnatado a 11%*	30 mL
OEP (*orvus es paste* – Proctor & Gamble)	0,8 mL

Meio I

Solução filha	95,4 mL
Água deionizada e destilada	4,60 mL

Meio II

Glicerol (Sigma)	10 mL
Solução filha	89,4 mL

*Leite desnatado a 11%

Leite desnatado	3,30 g
Água deionizada e destilada	30 mL

9.2 Solução de PBS (BARTH & OKO, 1989)

Solução Estoque	Para 100 mL de PBS
NaH_2PO_4 – 8g	30 mL
(diluir em 1000 mL de água destilada)	
Na_2HPO_4 – 9,47g	70 mL
(diluir em 1000 mL de água destilada)	
NaCL	0,45g

9.3 Soluções para avaliação da integridade de membrana (HARRISON & VICKERS, 1990)

Iodeto de Propídeo (IP)

IP	0,0005 g
Solução fisiológica	1 mL

Diacetato de Carboxifluoresceína (DIC)

DIC	0,0005 g
DMSO	1 mL

Solução de Trabalho

Citrato de sódio a 2,94% em água	1 mL
DIC	20 µl
IP	10 µl

9.4 Soluções para o teste de capacitação pela Clortetraciclina (GILLAN et al., 1997; AZEVEDO, 2006)

Solução de 1,4-Diazabicyclo [2 2 2] Octano DABCO: 0,22M

PBS	1,0 mL
DABCO (Sigma-D2522)	0,2468 g
Glicerol	9,0 mL

*separar em volumes de 1 mL e conservar abaixo de 0°C

Solução de HCL (4N)

HCL a 37% (JT-Baker-Mex-9535-02)	9,92 mL
Água Mili Q	30,0 mL

Solução estoque de clortetraciclina (CTC)

Tris	0,024 g
NaCl	0,076 g
L-Cisteína (Sigma –C7352)	0,006 g
Água Mili Q	10,0 mL

*ajustar o pH 7,8

*filtrar em filtro de 0,22µm e estocar a 4°C

Solução de trabalho de CTC

Solução de estoque de CTC	1000 µL
CTC (1mM Sigma-C4881)	0,00075 g (corrigir pela pureza)

*preparar diariamente e estocar a 4°C, protegida da luz

9.7 Ensaio da lipoperoxidação pelo método TBA (MAIA, 2006)

Reagente TBA

Ácido Tricloroacético (Mallinc Krodt Baker , 2928-08)	15 %
Ácido Tiobarbitúrico (FLUKA, 88481)	0,375 %
HCl (JT Baker, 9535-02)	0,25 M

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

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 fracos de 100mL e congelar.

Solução de Hidroxitolueno Butilado (BHT) 50 mM

BHT (ALDRICH, A-06107TC)	1,102 g	0,1102 g
Etanol	100 mL	10 mL

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 FeSO4 2,4 mM

FeSO4 (FLUKA, 44970)	0,013344g
H2O destilada	20mL

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 de MDA (ALDRICH10,838-3)	166 mL	17 mL
Solução HCl 2N	100 mL	10 mL

9.8 Ensaio do peróxido de hidrogênio (MAIA, 2006)

Solução de *Phenol Red* (PRS)

NaCl (JT-Baker, 3624-19)	140mM (0,818g/100mL)
Fosfato de potássio (pH 7.0) (Amresco) (0,1361g/100mL)	10mM
Dextrose (glicose)	5,5mM (0,099g/100mL)

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

Phenol Red (SIGMA, P3532)	0,01g
H_20 destilada	1 mL

Armazenar a 4°C em mini-tubo envolto em papel alumínio.

Solução Estoque Peroxidase 0,5mg/mL

Horse radish peroxidase (FLUKA, Biochemika 77330)	0,01g
Tampão Tris ou tampão fosfato (pH 7,0)	2mL

Armazenar a –20°C em alíquotas de 125µl.

Solução Estoque H_2O_2 10 mM

1- Diluir 1,02mL de H_2O_2 30% em 1000mL de água destilada (ultra pura);
(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} e corrigir o volume a ser adicionado.
4- Guardar em geladeira em frasco de vidro coberto com papel alumínio ou vidro âmbar até a utilização.

9.8 Setup 12.3 Hamilton Thorne Biosciences – IVOS 12.3

Analyses Setup	
Frame Rate	60 Hz
Frames Acquire	30
Minimum Contrast	56
Minimum Cell Size	5
Threshold Straightness	80.0
Medium Vap Cut-off	80.0
Low VAP Cut-off	20.0
Low VSL Cut-off	0.0
Nom-Motile Head Size	2
Nom-Motile Head Intensity	50

Minimum		Maximum
0.43	Static Size Limits	10.0
0.64	Static Size Limits	1.35
10	Static Elongation Limits	80

Calibration	
Magnification	1.95
Video Source	
Frequency	60 Hz
Field	Dark
Illumination	
Intensity	2400
Photometer Low	73
High	125

Trabalho enviado para a revista Theriogenology

Title: Status of lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen added of antioxidants and seminal plasma.

Carmen Cecilia Sicherle[a], Marciane da Silva Maia[b], Leandro Rodello[a], Renata Elisa Green[a], Hymerson Costa Azevedo[d], Sony Dimas Bicudo[a]. a: *Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil, b: Embrapa Semi Árido, Petrolina, Pernambuco, Brazil, d: Embrapa Tabuleiros Costeiros, Sergipe, Alagoas, Brazil.*

Corresponding author: Carmen Cecilia Sicherle

Mail adress of the corresponding author: Caixa postal 56 – Itatinga SP Brazil - zip code: 18690-000

Telefone: +55 14 81278449

e-mail: carmensicherle@terra.com.br

Abstract

The aim of this study was to evaluate the addition of seminal plasma and the antioxidants catalase and Trolox in frozen thawed ram semen on the lipid peroxidation status and generation of hydrogen peroxide. With this purpose four groups was established: CO (control group + 200µl of PBS), CAT (catalase- 12,5mg/ml in PBS), SP (60% of seminal plasma in PBS) and TRO (Trolox - 100µMol/100x10^6 sptz in PBS). All addition was in the proportion of 1: 1 (v:v). The addition of seminal plasma was deleterious ($P<0,05$) on lipid peroxidation, generating more TBARS than the others groups (CO = 1,2; CAT = 1,2; SP = 2,3; TRO = 1,4 nMol/10^8 sptz) on both, samples and in the generator system (+$FeSO_4$). Trolox had a beneficial effect on TBARS levels in the presence of exogenous +$FeSO_4$. ($P<0,05$).The generation of hydrogen peroxide was high also in the SP group, but only on the generator system (+H_2O_2). When evaluated alone, the extender and the seminal plasma generated high concentration of TBARS and H_2O_2 by their owns.

Keywords: ROS, antioxidants, seminal plasma, ram, semen, cryopreservation.

Introduction

The decrease of the spermatic viability of the ram semen after frozen thawed is a characteristic found by several authors [1,2,3,4,5].

The damages caused by cryopreservation includes structural, biochemical and functional changes, which can affect not only the fertilization capability, but also the integrity and the spermatic survival [1,6]. The fact that the spermatozoa is mobile does not mean it can be fertile.

One of the causes that can lead to a decrease of the spermatic viability is the generation of reactive oxygen species (ROS). The ROS are generated from the incomplete metabolism of the oxygen (O_2) with parts of the breathing chains of all the biologic systems that uses O_2. Under these physiologic conditions of the cellular metabolism, the O_2 over a four times reduction with the acceptation of four electrons generating as result a formation of hydrogen oxide. During this process other intermediaries reactive are formed, such as radicals as superoxide, hydroperoxile and hydroxyl and the non radical hydrogen peroxide (H_2O_2)[7].

The superoxide radical (O_2^-) are originate after the addition of an electron to the O_2. Since the O_2^- cannot surpass the plasmatic membrane, it stay restrict to the ambient it was generated. Nevertheless two molecules of anion superoxide unchanged quickly into H_2O_2 [8]. The H_2O_2 is extremely toxic to the cellule, not only because it is permeable to the cellular membrane, but also because it participates in the reaction that generates the hydroxyl radical (OH) from the oxidation of the transition metals, such iron and copper (Fenton reaction). The OH is considered the more reactive ROS of the biologic systems due to its strong reactivity with the biomolecules [7].

The ROS are spontaneous generated by mammals' spermatozoa, as part of the capacitating mechanism as soon as they leave epididimus tale [9, 10]. Up to this point, the ROS,

principally the superoxide anion, when produced in low quantities are recognized as a fundamental part to the manifestation of the spermatic capacitation, the spermatozoa hyper-activation of the motility, acrossomal reaction and the oocite fusion in humans [11,9,12,13,14], bovines [15] and equine [16].

However, the products generated from the oxygen metabolism, although part of the cellular physiology, when produces in high quantities start an oxidative process that ends with cellular death [17,18,19,20,8,21]. The main target of the ROS is the lipids contained in the cellular membrane, reaction known as lipid peroxidation [19]. The lipid peroxidation modifies the permeability and the flow of the plasmatic membrane. When present, the cytoplasmatic gout will also become a target of the ROS, so the spermatic pathology can also contribute to the oxidative process.

The mechanisms that the ROS are originated are not yet fully clarified. It is believed that the glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme is the reaction mediator since this enzyme controls the flux rate of the glucose, which controls the intracellular NADPH availability. This last one is used by the spermatozoa as electron source to generate ROS, thru an enzymatic system, the NADPH oxidase. So as this reaction happens in an unorganized manner it increases the production of ROS starting the lipid peroxidation that generates the loss of spermatic functions [22].

The spermatic cell is particularly sensible to the oxidative stress not only due to the membrane lipids, but also due to its inability of re-sensitizes of the membrane components and due to its low antioxidative capability [23].

Although it contains intracellular antioxidant enzymes, as it leaves the epididimus the spermatic cell counts with the protection of the seminal plasma (SP), which contains enzymatic antioxidants, such as SOD, CAT, GPx, GSH and GR and non enzymatic, such vitamin C and E, urato, albumin, taurine and hypotaurine, but the presence, quantity and

activity of these antioxidants are related to the specimen and to the fertility of the individual [24, 21].

The catalase acts in the reduction of H_2O_2 into H2O and O_2, in this way it avoids the formation of OH. Its activity depends on the NADPH, present in the spermatic membrane, in which the enzyme bind to protect itself from inactivity and increases its action [8]. The vitamin E inhibits the peroxidation of the lipids firstly by inhibiting the reaction that forms lipid hydroperoxides from the peroxyl radicals that are formed from H_2O_2 [25].

However the antioxidants contained in the SP seem to be insufficient to protect the spermatozoa from the hazard caused by the process of the criopreservation, such its susceptibility to the thermal chock during the cooling, to the osmotic stress and to the ice crystal formation during the freezing and thawing [23]. Besides a great majority of the spermatozoa when frozen-thawed do present a change on the state of the plasmatic membrane, similar to what happens during the capacitation process [26, 4]. Due to these reasons the researches are centered on the utilization of antioxidants, alike or analogues to that ones presents in the SP in bovine [27], swine [28, 29] and ram [30, 31, 32, 5, 33], with the objective of overcoming the effects caused by ROS. In the same way the addition of SP has been utilized as a way to decrease the hazards caused by the cooling and the criopreservation [18, 34, 35, 36, 37, 38].

The objective of the present study was to evaluate the addition of antioxidants catalase and Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2acid carboxylic) a vitamin E analogue and of 60% of seminal plasma to the frozen-thawed ram semen, assuming that these can be effective in protecting the spermatozoa from the hazards caused by the criopreservation, producing lower rates of lipid peroxidation and of H_2O_2.

Material and Methods

Semen collection and extension

There were used 13 rams from the Santa Inês breed, a Brazilian whooless breed, andrologically tested [39]. One ejaculate of each ram was collected and than the volume, conventional motility (0-100%) and vigor were determined. Only the rams that presented conventional motility of 80% or higher were utilized. After determined the spermatic concentration it was processed the extension with a glicina egg yolk milk extender [40] with a Ph 7,22 and osmolarity of 309 to obtain a final concentration of 400 X 10^6 sptz/mL. The dilution was done in two phases, being the first to add the extender I, portion without glycerol and the second phase to add the extender II with glycerol. All the extension was done at 32ºC. After the extension the semen was stored in mini straws with a concentration of 100 X 10^6 sptz.

Semen freezing protocol

The criopreservation of the semen was done in an automatic refrigerating and freezing system (Tetakon® - TK 3000, TK Tecnologia em congelação Ltda), utilizing the P3 S1 curve of the equipment, the refrigeration curve from 32ºC to 5ºC occurs in a rate of 0,25ºC per minute. When achieved the 5ºC temperature, the straws were kept at this temperature until complete a total of 120 minutes. After this period the cylinder contending the straws was submerse in a box filled with liquid nitrogen until it reached -120ºC [3]. At the end of the process the straws were immersed in liquid nitrogen, and stored at 196ºC, until processed.

Thawing procedures

The samples were thawed in a waterbath at 40ºC for 20 seconds [41] and the volume of each straw was placed in a pre-heated portable waterbath containing the treatments solutions as describe below:

1-CO Group (control): 200µl of PBS [42]

2-CAT Group (catalase): 12,5mg/mL (0,187 U/mL of catalase) = 8µl + 162 µl PBS = 200 µl

3-SP Group (seminal plasma): 60% of seminal plasma in PBS = 200 µl

4-TRO (Trolox): 100 µMol/100 X 10^6 sptz – 3,4 µl + 166,6 µl PBS

The lipid peroxidation and the concentration of H_2O_2 were determined after thawing and after 5 minutes of contact of the semen and the treatments.

Preparation of the antioxidants and seminal plasma

Seminal Plasma

Ejaculates from three different rams were collected. After each collection the ejaculate of all rams were mixed and rapidly placed in a cool centrifuged at 400XG for 15 minutes. After this period the supernatant was harvested and centrifuged again, at the same speed and time. The final supernatant was harvested and than strained thru a 0,22 µm strain and stored at 20ºC in 1 mL tubes until its utilization.

Catalase and Trolox

For the final concentration of 12,5 mg / mL of catalase, 0,0125g of catalase (Sigma) were diluted in 1,0 mL of TRIS buffered solution [5]. For 10mM of Trolox, 0,0125g of Trolox

(Aldrich) were diluted in 5 mL of Tris buffered solution [5].The solutions were prepared and stored at 20ºC in micro tubes until its utilization.

Determination of lipid peroxidation

The lipid peroxidation was realized by the spectrophotometer method of TBARS (tiobarbituric acid reactive substances), described by other authors [43], which is based in the quantification of the complex formed by the reaction of two molecules of tiobarbituric acid with one of malonaldehyde acid (MDA). All the analyses were done in a UV-VIS spectrophotometer (Perkin Elmer – Lambda 25) at 25ºC. Two straws from each ram and for each treatment were thawed, being one determined as sample and the other as generator system. For each straw it was repeated the method described for each treatment, where the semen stayed in touch with treatments for 5 minutes. After, for the samples, it was added 1 mL of the TBA solution (15% of tricloracetic acid, cloridric acid (HCL) 0,25M and 0,375% of tiobarbituric acid) and 15 µl of BHT 50mM (0,1102g of BHT in 10 mL of Ethanol) used to avoid the auto-oxidation of the lipids catalyzed by metal ions during the heating with tiobarbituric acid [44]. The tubes with these solutions were incubated in boiling water for 15 minutes and after cooled in ice bath. After cooling the samples were centrifuged at 1300X G for 15 minutes (Excelsa Baby II – 206R – Fanen - Brazil) and the supernatant was kept in ice until the spectrophotometer reading. For the generator system, on the process of the second straw of the same ram, it was added 100µl of heptahydrated iron sulfate (0,24mM), to induce the lipid peroxidation, followed by an incubation in waterbath at 37ºC for 15minutes. After incubation it was added 2mL of TBA solution and 30µl of BHT solution and the protocol was preceded as described above for the samples. This process is known as induced lipid peroxidation or catalyzed by iron and has the object

to measure all the potential of the sample in produce oxidants, regarding the generation of the radicals analyzed, being considered the generator system.

The analyses were made in duplicates and the absorbance was determined at 532nm against 1mL of TBA solution.

To calculate the concentrations of TBARS generated by the samples, the obtained results were compared to a calibration curve with a 10mM MDA solution (17mL of malonaldehyde bis in 10 mL of HCL 2N), for each mL of the TBA solution it was added the necessary MDA solution to result in a final concentration of 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25 and 30 nMol/mL. The calibration curve and the TBA solution were treated the same way as the samples.

The extender used to criopreserve and the SP in PBS were also analyzed separately to its lipid peroxidation.

The results were presented in nMol of TBARS/10^8 sptz or nMol/mL of extender.

Quantification of hydrogen peroxide (H_2O_2)

The H_2O_2 in the semen, in the extender and in the SP were measured thru the Phenol Red colorimetric method, in which the oxidation of the Phenol Red by the H_2O_2 measured by Horseradish Peroxidase (HRPO), the results in the formation of a compound of high absorbance at 610 nm [5].

For each ram and each treatment there were thawed two straws, one for the sample and one for the generator system. The initial procedure was the same as described for each treatment. After it was added at this mixture, (semen + treatment) kept at 37ºC, 975 µl of the Phenol Red buffered solution (PRS) (NaCl 140 mM, Potassium fosfate (ph 7,0) 10 mM, Dextrose 5,5 mM) and 10µl of HRPO solution (HRPO 1mg and 2 mL of PBS). This sample was incubated at 37ºC for 30 minutes and then cetrifugated at 4000 X G for 10

minutes (Excelsa Baby II – 206R – Fanen - Brazil). The supernatant were harvested and to the remaining solution was added 10µl of Sodium hydroxide (NaOH) at 1 N. The generator system was processed the same manner as the samples, the only difference was the addition of 10mM (11µl) of H_2O_2 hexogen right after the addition of all the other reagents.

The analyses were made in duplicates and the readings were done at 610nm against the PRS buffered solution together with a Phenol Red and HRPO solutions. For test patterns there were used known concentration of H_2O_2 (stock solutions of H_2O_2 – 102 µl of H_2O_2 at 30% in 100mL of distilled water that will result in a 10nMol solution, but the real concentration was measured to a absorbance of 230nm using a absorbing molar coefficient E=81M- 1cm-1, which generated a concentration of 9,4nMol). For this it was used several concentrations of this solution in the manner of obtain the final concentration of 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 and 100 µMol of H_2O_2 plus all the Phenol Red solution (PRS solution + Phenol Red solution + HRPO), after 5 minutes of incubation at ambient temperature it was added 10µl of NaOH at 1N and read at the UV-VIS spectrophotometer (Perkin Elmer – Lambda 25) at 25ºC.

The results were expressed in nMol of H2O2 / 40 X 10^6 sptz / 30 min.

Statistic Analyses

The analyses were done in a sketched in random blocks, regarding the blocks (rams) and three treatments (catalase, plasma seminal and Trolox) and the control. The effect of the treatments on the spermatic mobility, membrane integrity and spermatic capacitation parameters were tested thru the variance analysis (ANOVA) and the average comparison thru the Duncan's test where $P<0,05$ (Statigraf analise system).

Results

Lipid peroxidation

There was statistic difference between the treatments regarding the TBARS produced (P<0,05) (Table 1). The seminal plasma increased the production of TBARS in relation to the others treatments (fig. 1), as much as in the spontaneous lipid peroxidation as in the generator system (GS). The addition of catalase and Trolox did not differ from the control in the spontaneous lipid peroxidation. At the generator system the group added Trolox did generate a lower rate of TBARS. When analyzed separately both the extender and the seminal plasma did generated high rates of TBARS (table 3).

Hydrogen peroxidation (H_2O_2)

Through the ANOVA it was able to identify statistics differences between groups regarding the hydrogen peroxidation (H_2O_2) (table 2). The generation was higher in the samples of the group with seminal plasma (fig. 2). The groups with catalase or Trolox did not differ from the control group, or from the sample or the generator system (table 2). The extender and the seminal plasma did produce high rates of hydrogen peroxidation (H_2O_2) in the generator system, however in the samples alone the extender did generate high rates of H_2O_2, while the SP did not (table 3).

Discussion and Conclusion

The TBARS generation, lipid peroxidation, in the control group demonstrated that lipid peroxidation does occur after freeze-thawed ram semen without the additives interference. The generation of 1,2 nmol of TBARS/10^8 sptz did not differ from the found by other author [5], using the same methodology (1,26nmol TBARS/10^8 sptz). The methodology

used is of fundamental importance to the comparison of the lipid peroxidation, since the concentration of cellules in the sample does interfere directly in the levels of the lipid peroxidation. Another aspect to be observed is the addition of BHT, which was used in the TBARS technique of this experiment, due to the self oxidation of the lipids of the samples, this reaction was speedup by the metal ions during the heating with tiobarbituric acid as part of the methodology. This reaction could be avoided though the addition of BHT [44]. The TBA method also does facilitate the freedom of TBARS precursors from the oxidation of the proteins generating more TBARS. Some authors [43] used BHT in the reactive solution to minimize this reaction.

The addition of seminal plasma did increase the production of TBARS related to other treatments as much as in the spontaneous lipid peroxidation as in the catalyzed (generator system), probably this fact is due to the lipids (phospholipids and cholesterol) and the proteins in the SP, since the samples of only SP in PBS did also produce high values of TBARS (3,4nMol/mL).

In the thawed human semen without SP the addition of a 60% SP in buffered solution after its thawed, produced lower rates of lipid peroxidation (0,198nmol o TBARS/ 10^6) when compared to a control group and to the group with addition of 20% of SP (0,42 and 0,344 nmol of TBARS/10^6 respectively) [35].

In another study [18], it was added egg yolk, bovine, human, equine and ovine strained SP to the fresh ovine spermatozoa without the presence of SP and it was obtained 49, 10, 120, 132 and 122 nmol of TBARS/10^9 incubated with addition of FeSO4 and ascorbate. The bovine SP was the more effective in protecting the cellules from the lipid peroxidation. The rates obtained, in the present study, at the catalyzed lipid peroxidation (generator system) were much smaller in all groups, probably due to the addition of BHT that was not mentioned in this study by the authors.

The addition of Trolox and catalase did not differ from the control group during the spontaneous lipid peroxidation (SL) agreeing with other authors [5] that did not found difference between these treatments with the addition of 6,25mg/mL of catalase or 50µMol X 100 X 10^6 sptz of Trolox to the extender before the criopreservation of the semen, supposing the for the lipid peroxidation, it would be unconcerned to add the antioxidant before or after the freezing-thawing.

In the catalyzed lipid peroxidation by iron (generator system) the addition of Trolox was positive. It did produced less nmols of TBARS/10^8 sptz when compared to the other groups. The same could be observed by other authors [5] with the frozen ram semen and by the addition of vitamin E to the boar semen incubated during 5 days [28]. We can conclude that the Trolox acts in the expected manner in an oxidative stress situation inhibiting the reaction that forms the hidroperoxids [25].

The same could not be observed when we analyzed the TBARS rates produces by the extender alone, as much as the samples and for the generator systems, 3,0 and 3,2 nmol/mL respectively, these values are much higher than the ones with semen. We can analyze these figures through two sides: in the analysis with semen, we can conclude that the spermatozoa did also interacted with the extender, since in this samples the TBARS generation was smaller, maybe due to the action of substances in the SP of the donor; in the other hand the extender could not had contributed to the antioxidant action that had been consumed by the ROS produced by the extender ingredients, such the lipids of the egg yolk or the fructose.

Analyzing the H_2O_2 concentration the addition of SP did generate more H_2O_2 than in other groups, due probably to the same reason as the SP produces higher TBARS rates. According to other authors [11] the main target of the ROS are the lipids, proteins, sugars and core acids, what comes to agreement to the great part of the composition of the seminal

plasma. Nevertheless when the generation of H_2O_2 is analyzed, only in SP in PBS, the high levels of H_2O_2 observed on treatments groups did not occurred in this case (10,2 nmol/100 X 10^6 sptz/ 30 minutes in the control group and 1,6 nmol/mL in the SP with PBS group). Besides, in the generator system the SP in PBS generated 37,4 nmol/mL of H_2O_2. These results agree with other studies [30] in which ram semen did have little activity of catalase. Since the formation of H_2O_2 as much as in the extended semen as in the extender (26,4 nmol/mL) were superior to the catalase volume in these mediums. Nevertheless, the high production of ROS leads to a not only lipid peroxidation and to the DNA fragmentation, but also affects the production of ATP and of NADPH, once the activity of catalase also depends of the NADPH which binds to the catalase, protecting the enzyme from inactivation and increase its efficiency.

In conclusion, in the case of higher oxidative stress, the addition of Trolox to the frozen-thawed semen, in the experimented concentrations can be recommended, even when the roll of this antioxidant is to zero the ROS produced also by the extenders and solutions ingredients.

References

1- Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen i. processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Animal Reproduction Science 1995; 37: 185-249.

2- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. Reproduction Fertility and Development 1997; 9: 481-487.

3- Rodello L. Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino. 2006, pp. 86, Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

4- Azevedo HC. Integridade e funcionalidade dos espermatozóides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoléico e α-lactoalbumina. 2006, pp. 218. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

5- Maia MS. Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato e sódio (OEP), Trolox-c e catalase. 2006, pp. 147. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

6- Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science 2000; 62: 77-111.

7- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Revista da Associação Médica Brasileira 1997, 43, 1: 1-16.

8- Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radical Biology & Medicine 2001, 31, 11: 1287-1312.

9- Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D. Relationship between iron-catalyzed lipid peroxidation potential and human sperm function. Journal of Reproduction and Fertility 1993, 98: 257-265.

10- Aitken RJ. Possible redox regulation of sperm motility activation. Journal of Andrology 2000, 21, 4: 491-496.

11- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. Reviews of Reproduction 1997, 2: 48-54.

12- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. Reviews of Reproduction 1997, 2: 48-54.

13- Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. International Journal of Andrology 1997, 20: 61-69,.

14- Villegas J, Kchr K, Soto L, Henkel R, Miska W, Sánchez R. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. Andrology 2003, 35: 227-232.

15- O'flaherty C, Beorlegui N, Beconi MT. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. International Journal of Andrology 2003, 26: 109-114.

16- Baumber J, Sabeur K, Vo A, Ball BA. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. Theriogenology 2003, 60: 1239-1247.

17- Jones R, Mann T. Toxicity of Exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility 1977a, 50: 255-260.

18- Jones R, Mann T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. Journal of Reproduction and Fertility 1977b, 50: 261-268.

19- Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. Fertility and Sterility 1979, 31: 531-537.

20- 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, II: Cache River Press, 1999. pp. 455-467.

21- Guerra MMP, Evans G, Maxwell WMC. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. Revista Brasileira de Reprodução Animal 2004, 28, 4: 187-195.

22- Aitken RJ. The human spermatozoon – a cell in crisis? Journal of Reproduction and Fertility 1999, 115: 1-7.

23- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? Theriogenology 2002, 57: 327-344.

24-

25- Lieber D C. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. Toxicology 1993, 23, 2: 147-169.

26- Foote RH. Survival of bull sperm in milk and yolk extenders with added catalase. Journal of Dairy Science 1962, 45: 907-910.

27- Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R. Viability, susceptility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. Animal Reproduction Science 2000, 58: 99-111.

28- Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Martinez HR. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. Animal Reproduction Science 2003, 78: 85-98.

29- Maxwel WMC, Stojanov T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. Reproduction Fertility and Development 1996, 8: 1013-1020.

30- Ollero M, Muiño-Blanco T, López-Péres MJ, Cebrian Pérez JA. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in aqueous two-phase system effect of different cryoprotectants. Journal of Chromatography Biology , 680: 157-164.

31- Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Smith JF. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. Animal Reproduction Science 1997, 48: 269-278.

32- Sicherle CC, Maia MS, Bicudo SD, Green RE, Souza DB, Azevedo HC. The effect of trolox addition to egg yolk-tris extender on the motility and membrane integrity of frozen-thawed ram spermatozoa. In: 7th International Ruminant Reproduction Symposium, 1, 2006, Wellington. Anais. Wellington, New Zealand, 2006, pp.466.

33- Maxwell WMC, Mortimer S T, Gillan L, Gellatly ES, Mcphie CA. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. Reproduction Fertility and Development 1999, 11: 123-126.

34- Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T, Cebrían- Pérez JA. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. Biology of Reproduction 2000, 63: 1531-537.

35- Potts RJ, Notarianni LJ, Jefferies TM. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. Mutat. Research 2000, 447: 249-256.

36- Mortimer ST, Maxwell WMC. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. Reproduction 2004, 127: 285-291.

37- Graaf SP, Evans G, Gillan L, Guerra MMP, Maxwell WMC, O'brien JK. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the *in vitro* quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. Theriogenology, Article in Press, 2006.

38- Fonseca VO, Vale Filho VR, Mies Filho A, Abreu JJ. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA 1992, 31-31.

39- Gonzalez CIM. Avaliação *in vivo* de sêmen ovino (ovis áries) congelado em palhetas e *pellets* com diferentes diluidores. 1996: pp.135 Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

40-

41- Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa: Iowa State University Press – Ames, 1989.

42- La Penna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giamberardino MA, Cuccurullo F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. Free Radical Biology & Medicine 2001, 31, 3: 331-335.

43- Buege JA, Aust SD. Microssomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology, 1978, 52: 302-310.

Table 1 – Spontaneous lipid peroxidation in samples (SL) and in the generator system by 0,24 mmol de $FeSO_4$ (GS) in frozen-thawed ram semen (CO) and after the addition of catalase (CAT), seminal plasma (SP) and Trolox (TRO).

	TBARS (nmol/10^8 sptz)	
Group	Samples (SL)	GS
CO	$1,2 \pm 0,18^b$	$2,3 \pm 0,24^b$
CAT	$1,2 \pm 0,25^b$	$2,5 \pm 0,28^b$
PS	$2,3 \pm 0,25^a$	$3,3 \pm 0,18^a$
TRO	$1,4 \pm 0,20^b$	$1,6 \pm 0,18^c$

- Means within columns with different superscripts are significantly different (P<0,05).

Table 2 - Hydrogen peroxide concentration generated in samples and in the generator system (+ H_2O_2) in frozen-thawed ram semen (CO) and after the addition of catalase (CAT), seminal plasma (SP) and Trolox (TRO).

	H_2O_2 (nmol/100 x 10^6 sptz/ 30 min)	
Group	Samples	GS
CO	$10,2 \pm 1,25^b$	$36,7 \pm 3,86$
CAT	$10,2 \pm 0,67^b$	$32,0 \pm 3,59$
PS	$21,1 \pm 4,57^a$	$36,5 \pm 4,03$
TRO	$13,0 \pm 2,35^b$	$41,5 \pm 5,38$

- Means within columns with different superscripts are significantly different (P<0,05).

Table 3 –Concentration of Tiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) generated in the extender medium and in seminal plasma diluted in PBS during spontaneous lipid peroxidation (SL) or in the generator system by the addition of $FeSO_4$ (GS) and the hydrogen peroxide concentration in samples and on the generator system (+ H_2O_2).

Solutions	TBARS (nmol/mL)	H_2O_2 (nmol/mL)
Extender	$3,0 \pm 0,26$	$26,4 \pm 0,32$
Extender Generator System	$3,2 \pm 0,23$	$49,7 \pm 1,6$
Seminal plasma in PBS	$3,4 \pm 0,34$	$1,6 \pm 0,16$
Seminal plasma in PBS Generator System	$6,4 \pm 0,35$	$37,4 \pm 6,2$

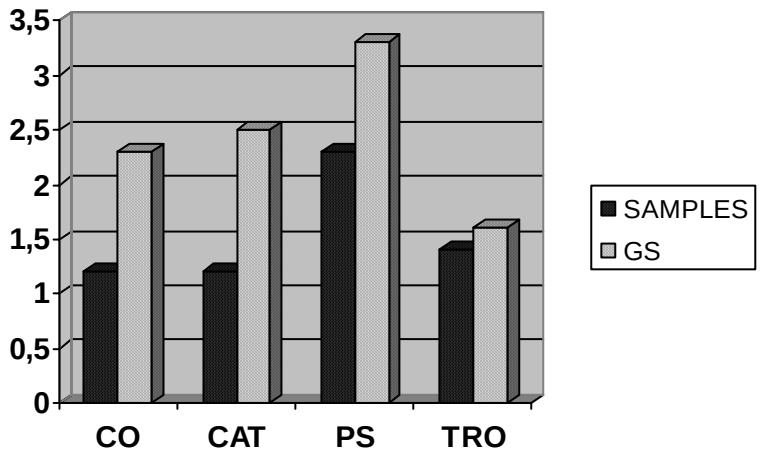


Figure 1: concentration of TBARS in samples during spontaneous lipoperoxidaton (SL) and in generator system (GS), in nmol/10^8 sptz nmol/10^8 sptz in control group and after the addition of catalase (CAT), seminal plasma (SP) and Trolox (TRO) in frozen-thawed ram semen.

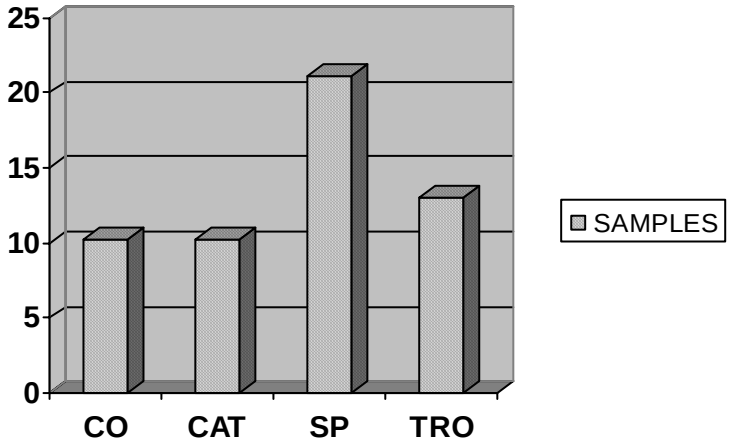


Figure 2: concentration of H_2O_2 in nmol/10^6sptz/30min, in control group (CO) samples and in samples after the addition of catalase (CAT), seminal plasma (SP) and Trolox (TRO), in frozen-thawed ram semen.