



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

JONATHAN MAIA DA SILVA COSTA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NO SÊMEN DE
CARNEIROS SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA APÓS
DESCONGELAMENTO**

**Petrolina – PE
2015**

Jonathan Maia da Silva Costa

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NO SÊMEN DE
CARNEIROS SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA APÓS
DESCONGELAMENTO**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elenice Andrade Moraes

Petrolina – PE

2015

Costa, Jonathan Maia da Silva

N975p Efeito da adição de antioxidantes no sêmen de carneiros sobre a qualidade espermática após descongelamento/ Jonathan Maia da Silva Costa. -- Petrolina, PE, 2015.

82 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, 2014.

Orientador: Elenice Andrade Moraes.

1. Trolox C. 2. Ácido Ascórbico. 3. Criopreservação. 4. *In vitro*. 5. Ovino. ÍI. Título. II. Universidade Federal do Vale do São

Francisco.

CDD: 080.75

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca

SIBI/UNIVASF

Bibliotecário:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jonathan Maia da Silva Costa

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NO SÊMEN DE
CARNEIROS SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA APÓS O
DESCONGELAMENTO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

Banca Examinadora

Elenice Andrade Moraes, Doutora, UNIVASF

Edilson Soares Lopes Júnior, Doutor, UNIVASF

Pedro Humberto de Souza Felix, Doutor, UNEB

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus pelo dom da vida, aos meus pais e a meu irmão, pela força, apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela dom da vida, pela sua onipresença, onisciência, onipotência. “Até aqui, tem me ajudado”, mesmo sem merecimento algum. O sentido do meu respirar...

A minha família, por sempre apoiar minhas escolhas acadêmicas. A minha mãe pelo amor incondicional, orações, palavras sábias e por não medir esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Ao meu pai, pela força, conselhos, cuidado e grande incentivo em todo tempo. Ao meu irmão, pelo companheirismo, amizade e por sempre acreditar em mim. Amo imensuravelmente todos vocês!!

À Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF– através do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, que me concedeu a oportunidade de realizar esse mestrado.

A professora e orientadora Elenice Andrade Moraes, pelos ensinamentos e apoio nesta fase, pela amizade, confiança, orientação e estímulo em sempre estar buscando o aprimoramento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco – FACEP pelo suporte financeiro para realização desse estudo.

À Universidade Estadual da Bahia (UNEB), pela parceria e disponibilidade em ceder seus reprodutores para realização deste estudo.

Ao amigo Wilde Lima, pela amizade, confiança e apoio. Uma parceria fundamental para concretização desse estudo, na qual podemos vivenciar cada momento dessa pesquisa.

Aos colegas de laboratório, Laio Ramon, Dailli Ingrid, Vitória Coelho e Laiane Magalhães, pela amizade e bons momentos de convivência e risadas, os quais não negaram esforços para me ajudar.

Ao Professor Pedro Humberto Félix de Sousa, pelo comprometimento, apoio, paciência e parceria, sendo fundamental para realização deste experimento.

Aos professores da UNIVASF, Edilson Soares Lopes Júnior, Mabel Freitas Cordeiro, David Rocha e Wagnér Félix, por fazerem parte da minha base de conhecimento, pelo convívio tranquilo e conselhos oportunos para realização deste trabalho.

Aos amigos de Pós-Graduação, Wasley Mattos, Thais Thatiane, Taís Jobard, Andréina Carvalho, Fábio Marcelo, Washington Luiz e Alice Maranhão, pelos ótimos momentos, pela amizade e ensinamentos.

A minha segunda família, todos os membros e amigos da Igreja Nazareno, em especial as minhas amigas Anny e Janine, ao Pr. Artur e sua esposa Luciene,

pelas orações, incentivo e conselhos sábios, que foram fundamentais nesta fase de minha vida.

À assistente administrativo da Pós-Graduação, Rosângela, pela atenção, paciência e boa vontade dispensada.

Ao Senhor Raimundo Parente, pela receptividade, atenção e boa vontade em ajudar.

Aos parceiros, Diego Costa, Aداuton Maia e Valdiney Araújo, pelo incentivo, momentos de descontração e amizade para uma vida toda.

A todos os meus amigos e colegas de aula dos cursos de Medicina Veterinária e Pós Graduação em Ciência Animal.

A todos os funcionários da UNIVASF, pela colaboração.

À Petrolina, minha segunda casa.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram em minha formação, tornando possível a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

EPÍGRAFE

“Quem cede à tentação depois de 5 minutos, nunca saberá o que teria acontecido se tivesse esperado por 1 hora.” (CS Lews).

Porque, para DEUS, nada é impossível.
Lc 1 vrs 37.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Redução de oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria, até a formação de água. (Fonte: Adaptada de Nordberg e Arner, 2001).	25
Figura 2. Produção de hidroxila a partir de peróxido de hidrogênio, ou reação de Fenton. (Fonte: Adaptada de Barreiros et al., 2006).	26
Figura 3. Estrutura molecular do ácido ascórbico (Vitamina C). (Fonte: Adaptada de Barreiros et al., 2006).	31
Figura 4. Estrutura molecular do Trolox C (6-hidroxi-2,5,7,8-tetra-metil-chroman-2-ácido carboxílico. (Fonte: Adaptada de Rezk et al., 2004).	33
Figura 5. Fotômetro SpermaCue para determinar a concentração espermática. (Fonte: Arquivo Pessoal, 2015).	51
Figura 6. Espermatozoides de carneiros corados com PI e Hoechst 33342. Espermatozoides com membrana plasmática intacta (A) e lesada (B).	57
Figura 7. Espermatozoides de carneiros corados com FITC-PNA. Células espermáticas com membrana acrossomal intacta (A) espermatozoide com membrana acrossomal intacta e reagida/lesada (B).	58
Figura 8. Cauda de espermatozoides de carneiros corados com R123. Células espermáticas com atividade mitocondrial (A) e sem atividade (B).	58
Figura 9. Espermatozoides corados com Hoechst 33342 ligados a MPV da gema de ovo.	59

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Motilidade total e progressiva de espermatozoides descongelados de carneiros tratados ou não com diferentes concentrações de antioxidantes antes da criopreservação (Média±DP)	56
Tabela 2. Integridade da membrana plasmática e do acrossoma, e atividade mitocondrial de espermatozoides descongelados de carneiros tratados ou não com diferentes concentrações de antioxidantes antes da criopreservação (Média±DP)	57
Tabela 3. Número (absoluto e relativo) de espermatozoides após descongelamento de carneiros, tratados ou não com diferentes concentrações de antioxidantes antes da criopreservação, ligados a MPV (Média±DP)	59

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus celsius
%	Por cento
μM	Micromol
AA	Ácido ascórbico
ANAVA	Análise de variância
APMM	Alto potencial de membrana mitocondrial
ATP	Adenosine triphosphate (adenosina trifosfato)
BPMM	Baixo potencial de membrana mitocondrial
CASA	Computer-Assisted Semen Analysis (Sistema de análise espermática computadorizada)
CAT	Catalase
cm	Centímetro
Cu	Cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
Fe	Ferro
FITCH	Isotiocianato de fluoresceína
FITCH-PNA	Aglutinina de <i>Arachis hypogea</i> conjugada com isotiocianato de fluoresceína
FITCH-PSA	Aglutinina de <i>Psium sativa</i> conjugada com isotiocianato de fluoresceína
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSH-Red	Glutationa redutase
h	Hora (s)
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO ₂ ⁻	Hidroxiperoxila
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
K	Potássio
LIN	Linearidade
mg	Miligrama

mL	Mililitro
Mn-SOD	Manganeso Superóxido Dismutase
mOsm	Miliosmole
MP	Motilidade progressiva
MPV	Membrana perivitelina
MT	Motilidade total
Na	Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidreto
nM	Nanômetro (s)
NO ₃	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
OH [°]	Hidroxila
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Iodeto de propídeo
R123	Rodamina
ROS	Reactive oxygen species
s	Segundo (s)
SOD	Superóxido dismutase
TRO	Trolox C
UI	Unidade (s) internacional (is)
X-XO	Xantina-xantina oxidase
Zn-SOD	Zinco superóxido
α	Alfa
γ	Gama

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de Trolox C e ácido ascórbico no sêmen fresco de carneiros antes da criopreservação sobre a qualidade dos espermatozoides descongelados. Foram coletados 10 ejaculados de cada carneiro (n=3), sendo dois da raça Dorper e um da raça Santa Inês, através de vagina artificial. Os ejaculados foram diluídos com Tris-Gema de ovo, e subdivididos em 5 tubos, onde foram adicionadas as concentrações: controle, sem antioxidante; 100 µL (TRO100), e 200 µL (TRO200) de Trolox C; 0,05% (AA0,05), e 0,25% (AA0,25) de Ácido Ascórbico. Após a adição, as amostras tratadas foram acondicionadas em câmara fria a 5°C/2h. Em seguida, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5ml, seladas, colocadas por 15 minutos sob vapores do nitrogênio líquido a 8 cm da lâmina líquida, e ao final deste tempo foram imersas no nitrogênio líquido. O descongelamento foi feito a 37°C/30s e foi avaliado quanto à motilidade, integridade da membrana plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial e teste de ligação. Para a avaliação da motilidade total e progressiva, as amostras foram descongeladas a 37°C/30s. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A motilidade total foi maior para o sêmen tratado com AA0,25 e TRO200 do que os demais tratamentos ($P<0,05$), e a progressiva foi maior em todos tratados com antioxidante em relação ao controle ($P<0,05$). A adição de AA0,25 apresentou maior integridade de membrana plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial e capacidade dos espermatozoides de se ligar a membrana perivitelina da gema de ovo comparado aos demais tratamentos ($P<0,05$). A adição de 0,25% de ácido ascórbico no sêmen fresco de carneiros melhorou as características espermáticas após descongelamento.

Palavras-chave: ácido ascórbico, criopreservação, *in vitro*, ovino, Trolox C

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of adding different concentrations of Trolox C and ascorbic acid in fresh semen ram before cryopreservation on the quality sperm. Ten ejaculates were collected from each ram (n=3), two of Dorper and one Santa Ines through artificial vagina. The ejaculates were diluted with Tris-egg yolk and subdivided into 5 tubes, and concentrations of antioxidants added: control, no antioxidant; 100 μ L (TRO100) and 200 μ L (TRO200) of Trolox C; 0.05% (AA0.05) and 0.25% (AA0.25) of ascorbic acid. The samples were cooled to 5°C/2h, packaged into 0.5ml straws, and frozen in static liquid nitrogen vapor for 15min before being plunged into liquid nitrogen. Straws were thawed at 37°C for 30s. The samples were evaluated for motility, plasma membrane integrity and acrosomal, mitochondrial activity and binding test. Data were submitted to ANOVA and means compared by Tukey test at 5% probability. The total motility of sperm treated with AA0.25 and TRO200 was higher than other treatments (P<0.05), and the progressive was higher in all treated with antioxidant compared to the control (P<0.05). The addition of AA025 demonstrated greater integrity of plasma membrane and acrosomal, mitochondrial activity and the ability of sperm to bind perivitelline membrane compared to the other treatments (P<0.05). Adding 0.25% of ascorbic acid to ram sperm prior to cryopreservation improved sperm characteristics after thawing.

Keywords: ascorbic acid, cryopreservation, *in vitro*, ram, Trolox C

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO	17
II. DESENVOLVIMENTO	19
1. REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1. Estrutura dos espermatozoides e membrana plasmática	19
1.2. Capacitação espermática e reação acrossômica	19
1.3. Criopreservação espermática e diluidores	21
1.4. Espécies reativas de oxigênio (ERO)	24
Radical superóxido (O_2^-)	25
Radical hidroxila (OH^\bullet)	26
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	27
1.5. Antioxidantes	27
1.5.1. Antioxidantes enzimáticos	28
Superóxido dismutase (SOD)	28
Catalase (CAT)	29
Sistema glutaciona	30
1.5.2. Antioxidantes Não enzimáticos	31
Ácido ascórbico (Vitamina C)	31
Trolox C (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico)	32
1.6. Atuação das ERO e antioxidantes na função espermática	34
1.6.1. Produção de ERO no sêmen	34
1.6.2. ERO e a capacitação espermática	36
1.6.3. Danos causados ao espermatozoide pelas ERO	37
1.6.4. Efeitos na viabilidade espermática sobre o uso de antioxidantes	38
1.7. Avaliação da fertilidade do sêmen	40
1.8. Integridade das membranas	41
1.9. Avaliação da fecundação <i>In vitro</i>	44
2. JUSTIFICATIVA	46
3. OBJETIVOS	47
3.1. Objetivo geral	47
3.2. Objetivos específicos	47

4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1. Aspectos éticos	48
4.2. Local de execução	48
4.3. Animais experimentais e coleta de sêmen	48
4.4. Avaliação de sêmen fresco	50
Avaliação computadorizada da motilidade espermática	50
Avaliação da concentração espermática	50
4.5. Diluição e criopreservação do sêmen	51
4.6. Avaliação dos tratamentos	52
4.6.1. Avaliação computadorizada da motilidade espermática	52
4.6.2. Avaliação da integridade da membrana plasmática	52
4.6.3. Avaliação da integridade da membrana acrossomal	53
4.6.4. Avaliação da atividade mitocondrial	53
4.6.5. Teste de ligação	54
Preparação da membrana perivitelina	54
Ensaio de ligação a MPV in vitro	54
4.7. Análise estatística	55
5. RESULTADOS	56
5.1. Motilidade espermática	56
5.2. Integridade da membrana plasmática e acrossomal, e a atividade mitocondrial	56
5.3. Capacidade de ligação espermática a MPV	59
6. DISCUSSÃO	60
III. CONCLUSÃO	65
IV. REFERÊNCIAS	66
V. ANEXOS	79

I. INTRODUÇÃO

Dentre as biotécnicas existentes para a reprodução de caprinos e ovinos, a inseminação artificial (IA) é a mais utilizada e aquela que proporciona maior amplitude de resultados (BICUDO; SOUSA, 2003), pois possibilita a utilização de sêmen de um único macho para um grande número de fêmeas.

A criopreservação de sêmen de animais domésticos associada à IA é fundamental em qualquer programa de ganho genético, por estocar material genético de animais que estejam temporariamente ou permanentemente inábeis à reprodução, permitir a ampla difusão do material genético de animais considerados superiores, e daqueles que estejam ameaçados de extinção (SALAMON; MAXWELL, 1995; 2000).

A descoberta de substâncias denominadas crioprotetores, foi primordial para minimizar os danos causados pela criopreservação. Estes são capazes de atravessar a membrana plasmática, gerando desidratação celular e evitando a formação de cristais de gelo, durante o processo de congelamento e descongelamento (MEDEIROS et al., 2002).

Entretanto, o sucesso da criopreservação é parcial, uma vez que o processo de congelamento/descongelamento danifica cerca de 50% dos espermatozoides. Isso ocorre porque, durante a criopreservação a célula passa por uma série de modificações causadas pelo gradiente osmótico gerado entre o meio intracelular e extracelular, o qual pode resultar em danos as membranas plasmática e acrossomal (MAIA, 2006).

Este desequilíbrio entre as concentrações fisiológicas de oxidantes e antioxidantes resultam no aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO) geradoras de radicais livres (GUERRA; EVANS; MAXWELL, 2004), dentre as quais se destacam os superóxidos (O_2^-), a hidroperoxila (HO_2^\bullet), a Hidroxila (OH^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), (NORDBERG; ARNÉR, 2001), os quais, em níveis exacerbados reduzem a motilidade e viabilidade dos espermatozoides e, conseqüentemente, a taxa de fecundação (ISACHENKO et al., 2004; COLETO, 2006), através da interação com lipídeos da membrana, proteínas, DNA mitocondrial e nuclear (GUERRA, 2004; BARREIROS, 2006).

No intuito de manter a integridade das membranas e a viabilidade espermática, experimentos utilizando antioxidantes (Trolox C, Vitamina C, Catalase, Superóxido dismutase), adicionados ao meio diluidor, tem sido empregados em várias espécies (BILODEAU et al., 2000; 2002; BORGES, 2008; MAIA, 2010), a fim de que os mesmos sejam capazes de inibir e minimizar a produção das espécies reativas de oxigênio, sem interferir nos parâmetros da viabilidade espermática.

Esta necessidade inclui, além da identificação dos antioxidantes, as suas melhores concentrações, que diminuam o estresse oxidativo e danos espermáticos, possibilitando a elaboração de um diluente mais eficaz.

Espera-se que os resultados aqui obtidos possam contribuir sinergicamente na resolução da problemática que tem sido à busca de melhores resultados de fertilidade do sêmen ovino criopreservado.

II. DESENVOLVIMENTO

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Estrutura dos espermatozoides e membrana plasmática

Podemos definir o espermatozoide como uma estrutura composta de microtubulos condensados, fibras e estruturas membranosas, onde cada um desses componentes obtém resposta única ao sofrer choque térmico no processo de criopreservação (BORGES, 2008). As células espermáticas são formadas dentro dos túbulos seminíferos dos testículos, os quais apresentam uma série complexa de células germinativas em desenvolvimento, as quais, posteriormente, formarão os gametas masculinos. Essas células quando completamente desenvolvidas, apresentam forma alongada e são constituídas por cabeça e cauda/flagelo, sendo a cauda subdividida em colo e nas peças intermediária, principal e terminal (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Em toda a sua extensão, o espermatozoide é recoberto pela membrana plasmática, porção mais externa que envolve toda a célula espermática, a qual difere sua natureza regional, sendo composta por fosfolipídeos que englobam a maior parte dos lipídeos presentes em toda a sua extensão, diferindo sua natureza de acordo com a região. Os fosfolipídeos possuem uma cadeia de ácidos graxos, predominantemente, poli-insaturados, os quais, quando submetidos a altas temperaturas, adquirem forma cônica, com extremidades hidrofóbicas externas e hidrofílicas internas, aumentando a permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem o influxo de íons e pequenas moléculas, desestabilizam a membrana, ocasionam danos irreparáveis e perda da viabilidade (AMANN; PICKET, 1987; EDDY; O'BRIEN, 1994; FLESH e GADELLA, 2000).

1.2. Capacitação e reação acrossômica

Os espermatozoides maturados na cauda do epidídimo são capazes de mover-se livremente, embora, ainda não possua imediata capacidade fecundante, a qual é adquirida após a capacitação espermática. Em

ruminantes, a capacitação espermática é iniciada na cérvix, pela passagem dos espermatozoides nas microestruturas cervicais (SCOTT, 2000), proporcionando a remoção e modificação de componentes derivados dos testículos, como as glicoproteínas, bem como aquelas que foram absorvidas ou ligadas à membrana plasmática dos espermatozoides em detrimento do plasma seminal (BALL e VO, 2002). Durante a capacitação, a membrana plasmática sofre as principais mudanças, mantendo contato direto com o meio capacitante.

Dentre estas mudanças, a depleção da relação colesterol/fosfolípido na superfície espermática permite o aumento da fluidez da membrana, principalmente pela elevação da concentração de fosfatidilcolina, que desestabiliza a membrana, gerando alterações nas glicosaminoglicanos, influxo de íons de cálcio, aumento do nível de AMP cíclico e modificações de algumas atividades enzimáticas, principalmente a proteína quinase C (O'FLAHERTY; BEORLEGUI; BECONI, 1997; BILODEAU et al., 2000).

Após a ejaculação, os espermatozoides são expostos as principais proteínas do plasma, conhecidas como BSP, os quais, cobrem a membrana do espermatozoide e aceleram a capacidade dos indutores. Esta ligação interage com lipoproteínas de alta densidade (HDL), estimulando o processo de capacitação. Assim, com todas as células sob condições aeróbicas, os espermatozoides são capazes de gerar radicais livres (BALL; VO, 2002; BAUMBER et al., 2003), em sua maioria, originados de atividade metabólica normal (DE LAMIRANDE et al., 1997). Radicais livres como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO_3), induzem hiperativação, capacitação e reação acrossômica (DE LAMIRANDE et al., 1997), os quais em baixas concentrações, são fundamentais na função espermática, especificamente na fosforilação de tirosina (DE LAMIRANDE et al., 1997; BALL; VO, 2002; BAUMBER et al., 2003). A fosforilação de tirosina, por sua vez, possui uma variedade de funções celulares, como regulação do crescimento, controle de ciclos celulares, regulação de íons, formação do citoesqueleto celular (termo-sensível) (BRENER et al., 2003), além de ser um componente essencial à capacitação espermática (MEYERS; TABLIN; CONE, 2003).

Vale ressaltar que o estresse osmótico (CURRY; WATSON, 1994) e oxidativo causam injúrias na membrana plasmática e acrossomal, contribuindo na antecipação da capacitação e reação acrossômica, tanto no processo de refrigeração quanto no de congelamento/descongelamento, causando a redução da longevidade dos espermatozoides (CURRY, 2000).

A capacitação é finalizada quando ocorre a exocitose, processo denominado de reação acrossomal, momento em que os espermatozoides possuem o estímulo adequado. Este evento tem ao menos duas funções principais: condicionar o espermatozoide para atravessar zona pelúcida e se fundir com a membrana do oócito (YANAGIMACHI, 1994).

1.3. Criopreservação espermática e diluidores

A criopreservação oferece vantagens à indústria da produção animal, principalmente aquelas voltadas a programas de melhoramento genético, viabilizando a estocagem de material genético daqueles animais que estejam temporariamente ou permanentemente inábeis à reprodução e permitindo a ampla difusão do material genético de animais considerados superiores, bem como aqueles que estejam ameaçados de extinção (SALAMON; MAXWELL, 1995; 2000).

O processo de criopreservação é determinado desde o preparo de diluição do sêmen até a manutenção da capacidade funcional dos espermatozoides pós-descongelamento, sendo que, em cada fase, os espermatozoides podem perder sua habilidade funcional (WATSON, 1995; AZEVEDO, 2006).

Durante este processo a célula espermática sofre variações bruscas de temperatura o que altera a organização dos seus componentes estruturais, afetando suas propriedades. Estas alterações estão associadas a mudanças na permeabilidade e na habilidade de sofrer fusão, o que favorece o aparecimento de inchaços e rupturas na membrana plasmática e acrossomal externas, alterações na fluidez da membrana, desregulação no influxo de cálcio intracelular e alterações na atividade enzimática (JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2001).

Deste modo, algumas hipóteses são lançadas, destacando-se aquela de que a criopreservação possa produzir uma subpopulação, pois há uma possibilidade que os espermatozoides que sobrevivem ao processo de congelação-descongelação, não sejam apenas uma população aleatória, mas uma selecionada, sugerindo que esta subpopulação seja resistente à criopreservação, uma vez que, suas membranas permaneceram estáveis aos estímulos fisiológicos sofridos (WATSON, 2000; BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000).

A sobrevivência dos espermatozoides ainda é afetada por vários fatores, como: a velocidade de congelamento e descongelamento, temperatura inicial do congelamento, qualidade de sêmen, composição do diluidor, concentração do crioprotetor, além da embalagem (palheta, minitubo, pelets) utilizada para armazenar o sêmen (SALAMON; MAXWELL, 2000; BAG et al., 2002). Tais fatores acarretam danos ao espermatozoide, resultando em consequências como: a diminuição dos parâmetros de cinética espermática, redução da integridade das membranas plasmática e acrossomal, a redução da função mitocondrial e o incremento das alterações morfológicas dos espermatozoides (GILLAN; MAXWELL; EVANS, 2004).

Segundo Moore et al. (2006), existem, pelo menos, dois pontos principais a serem considerados na técnica de congelação-descongelação. O primeiro está relacionando aos efeitos das mudanças de temperaturas e o segundo aos processos de desidratação celular e formação de cristais de gelo.

Durante o processo de congelação do sêmen, a redução de temperatura pode afetar a capacidade respiratória do espermatozoide, pois, durante o procedimento, as bombas adenosina trifosfato dependentes, dentre elas, a de Na^+/K^+ , são comprometidas, acarretando as despolarizações parciais das membranas, tornando-as permeáveis ao cálcio, induzindo, assim, a vesiculação prematura da membrana acrossomal e danificando a membrana mitocondrial (AMANN; PICKETT, 1987; BICUDO et al., 2007). Danos à motilidade espermática também são ocasionados, ocorrendo injúrias na arquitetura da bainha mitocondrial, o que resulta na baixa disponibilidade de energia (GILLAN; MAXWELL; EVANS, 2004).

Outro fenômeno observado ocorre principalmente quando as taxas de resfriamento, excessivamente rápidas, são usadas, não havendo tempo

suficiente para que a água saia da célula, ocasionando um super-resfriamento e uma crescente probabilidade de se ter a formação de cristais de gelo no interior celular, que, normalmente, é letal (AZEVEDO, 2006).

Deste modo, é preferível que o processo de desidratação celular acompanhe a congelação lenta, o que é, potencialmente, benéfico à sobrevivência da célula, enquanto que as excessivas taxas de congelação rápidas são consideradas como a principal causa da morte celular.

Devido às crioinjúrias ocorrentes no processo de criopreservação de sêmen, se faz necessária a utilização de substâncias denominadas crioprotetores. Essas substâncias são de baixo peso molecular e de baixa toxicidade, as quais são capazes de atravessar a membrana plasmática, evitar a formação de cristais de gelo, elevando, assim, os níveis de sobrevivência celular durante o processo de congelamento e descongelamento (MEDEIROS et al., 2002).

Na tentativa de desenvolver um meio capaz de conservar o máximo de células espermáticas durante o processo de congelamento/descongelamento estudos têm sido realizados a fim de unir em único diluidor qualidades como: manutenção do pH próximo da neutralidade, capacidade de proteção a choque térmicos, manutenção de equilíbrio eletrolítico e pressão osmótica ideal (300 mOsm), atuar como fonte energética, inibir o crescimento microbiano, estabilizar sistemas enzimáticos, permitindo, assim, a preservação da motilidade e integridade das membranas dos espermatozoides (PURDY, 2006).

Nos programas de criopreservação de sêmen, os diluidores mais utilizados são compostos de gema de ovo e/ou leite, tais como, o citrato-glucose-gema de ovo (SALAMON; MAXWELL, 2000), rafinose-citrato de sódio-gema de ovo-glicerol e o meio tris-gema de ovo-glicerol, (FOOTE; BROCKETT; KAPROTH, 2002). Entretanto, o uso de outros diluidores têm sido testado com sucesso na criopreservação de sêmen de pequenos ruminantes, como aqueles à base de água de coco (ACP-102), relatado por Salgueiro et al. (2002) e lecitina de soja (FUKUI et al., 2008).

Os crioprotetores, por sua vez, são divididos em intracelulares e extracelulares. Dentre os intracelulares, podemos citar: glicerol, etilenoglicol, acetamina, dimetilsulfóxido, atuantes também no meio extracelular. Já os crioprotetores extracelulares são formados por grandes moléculas, não

conseguindo assim, atravessar a membrana, tais como as proteínas presentes no leite e gema de ovo, além de açúcares, como, lactose, trealose, entre outros (PICKETT; AMANN, 1992). O diluente Tris, por sua vez, associado a aditivos é uma realidade para os trabalhos de criopreservação, o qual permite uma melhora na motilidade após a descongelação, na integridade acrossomal e, conseqüentemente, na fertilidade. Aboagla e Terada (2004) utilizaram o diluente Tris-Gema com trealose, em concentrações diferentes, onde observaram melhora significativa da motilidade (80%) e do vigor (65%) nos referidos tratamentos.

Entretanto, mesmo com a utilização de crioprotetores, o sêmen de ovinos é sensível a variações externas decorrentes no processo de congelamento e descongelamento, implicando em danos físicos e químicos nas células espermáticas, alterando as membranas plasmáticas e acrossomal entre -10°C e -25°C , quando há a formação dos cristais de gelo (SALAMON; MAXWELL, 1995), o que reduz a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides e, conseqüentemente, a fecundação (ISACHENKO et al., 2004; COLETO, 2006).

1.4. Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Quimicamente os metabólitos reativos do oxigênio são substâncias que apresentam número ímpar de elétrons, sendo, portanto, altamente energéticos e instáveis. As espécies reativas de oxigênio (ROS do termo inglês: reactive oxygen species), radicais livres ou ainda oxidantes, são termos usados para identificar os intermediários químicos do metabolismo do oxigênio. Entretanto, o termo radical livre não é o mais adequado a ser utilizado, pois nem todos os metabólitos reativos do oxigênio são radicais livres. O mesmo se pode dizer do termo oxidante, partindo do princípio que algumas ERO atuam como agentes oxidantes e como redutores, desde que em sistemas diferentes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001; MAIA, 2010).

O uso fisiológico das espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas células começa a ser demonstrado em áreas como a da sinalização intracelular e regulação redox. As ERO são produzidas pelo metabolismo aeróbico normal, no entanto quando a sua produção se torna excessiva promovem danos

O radical superóxido tem sua formação em quase todas as células aeróbicas, sendo produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos e eosinófilos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). De maneira espontânea, sua formação ocorre especialmente, na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória, sendo produzido também por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (NORDBERG; ANÉR, 2001; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Além disso, é um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar membranas lipídicas, agindo, portanto, apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

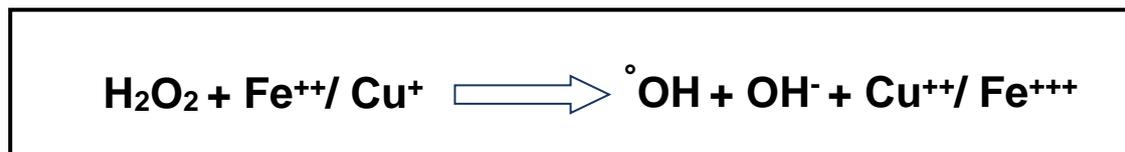
Radical hidroxila (OH°)

Formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), denominada, Reação de Fenton (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001), possui limitada capacidade de difusão, no entanto, esses radicais possuem meia vida curta, atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição de insaturações. Entre os radicais, é considerado o mais reativo em sistemas biológicos, podendo ocasionar maiores danos do que qualquer outra ERO (NORDBERG; ARNÉR, 2001; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Quando o radical hidroxila é produzido próximo ao DNA sendo fixado a metais, modificações poderão ocorrer nas bases purínicas e pirimídicas, levando a mutação ou inativação do DNA, esta alta reatividade torna-se responsável também pelas maiores alterações no RNA, ou seja, é a ERO mais deletéria ao organismo, a qual pode desencadear a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1999; BARREIROS; DAVID; DAVID., 2006).

O radical hidroxila pode ser facilmente sequestrado *in vitro* por inúmeras moléculas, devido a sua alta reatividade, porém, para que os resultados *in vitro* se reproduzam *in vivo*, é necessário administrar altas concentrações de antioxidante, permitindo que este alcance o local onde o radical hidroxila esteja presente, em concentração suficiente para suprimi-lo.

Figura 2: Produção de hidroxila a partir de peróxido de hidrogênio, ou reação de Fenton (Fonte: Adaptada de Barreiros et al., 2006).



Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

Embora o peróxido de hidrogênio não seja classificado como um radical livre, ele é um metabólico do oxigênio gerado a partir da dismutação enzimática do O_2^- pelo superóxido dismutase, possui vida longa, é extremamente deletério e auxilia como intermediário na reação que produz o OH^\bullet (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

O peróxido de hidrogênio, isoladamente, é praticamente inócuo, porém apresenta uma elevada permeabilidade e estabilidade, difundindo-se rapidamente através da membrana plasmática, devido ao fato da célula possuir metais de transição exercendo importante papel no estresse oxidativo, sendo talvez o mais apto a promover alterações nos sistemas enzimáticos intracelulares (BAUMBER et al., 2000; NORDBERG; ARNÉR, 2001). Uma vez produzido, o H_2O_2 é removido parcialmente por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes: catalase, glutathione peroxidase e peroxidases ligadas a tioredoxina (NORDBERG; ARNÉR, 2001; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

1.5. Antioxidantes

De acordo com Stedman (2003), o termo antioxidante significa impedir a oxidação de outras substâncias químicas, tendo por função regenerar o substrato ou prevenir a oxidação do mesmo. O equilíbrio entre agentes óxido-redutores com as ERO e o sistema de defesa antioxidante é essencial, uma vez que estes agentes são gerados de maneira endógena como decorrente ao metabolismo do oxigênio (COLETO, 2006).

Os antioxidantes atuam na prevenção da oxidação das células, as quais também possuem um mecanismo de defesa que podemos dividir em duas categorias: uma como detoxificadora do agente oxirredutor, constituída por superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona-peroxidase (GSH – Px), glutaciona reduzida (GSH) e vitamina E (GUERRA et al., 2012); e outra responsável por reparar a lesão ocorrida, sendo composta por glutaciona-redutase (GSH-Rd), glutaciona peroxidase (GSH-Px) e ácido ascórbico (vitamina C), entre outros (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GUERRA et al., 2012). De acordo com suas características os antioxidantes podem ser divididos em sistemas enzimáticos e não enzimáticos.

1.5.1. Antioxidantes enzimáticos

Os antioxidantes enzimáticos são macromoléculas, advindas ou não do próprio organismo, as quais atuam contra as ERO, agindo diretamente sobre esses agentes ou reparando os danos causados por eles (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os antioxidantes enzimáticos são aqueles conhecidos como antioxidantes naturais, previnem os danos à estrutura celular e neutralizam os metabólicos excessivos, em de sistemas reprodutivos, pode-se observar uma discrepância nas concentrações e no papel protetor dessa enzima entre machos férteis e inférteis (KASIMANICKAM et al., 2006), o que sugere uma correlação positiva entre a ação antioxidante e a fertilidade (COLETO, 2006).

Dentre os antioxidantes enzimáticos as principais enzimas são: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Peroxirredoxins (PrX), Glutaciona (GSH), Glutaciona redutase (GR) e Glutaciona peroxidase (GPx), as quais serão abordados no tópico seguinte (ANDRADE et al., 2010).

Superóxido dismutase (SOD)

A SOD foi à primeira descoberta entre as enzimas metabolizantes das ERO, contabilizada como a enzima mais abundante do organismo, ela tem por função catalisar a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e H₂O₂ (NISHIKIMI; MACHLIN, 1975; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Nas células

de mamíferos a SOD se apresenta em duas formas, o cobre superóxido dismutase (Cu-SOD) e zinco superóxido dismutase (Zn-SOD), presentes no citosol; e a Mn-SOD, presente na mitocôndria (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Quando a SOD remove o radical superóxido, convertendo em peróxido de hidrogênio, o mesmo é encontrado tanto na célula espermática quanto no plasma seminal.

Nesse contexto, estudos sobre a sua atuação da SOD vêm sendo realizados quanto a seu poder antioxidativo, tanto na sua produção endócrina quanto na implementação externa do mesmo na técnica de criopreservação (BILODEAU et al., 2000; MARTI et al., 2008; SILVA et al., 2011).

Marti et al. (2008) compararam a atividade de SOD entre amostras de sêmen ovino (fresco e resfriado) e sêmen congelado e puderam observar que a atividade de SOD foi duas vezes maior nas amostras de sêmen (fresco e resfriado) do que em sêmen congelado, que, por sua vez, apresentou uma redução de 65%.

Câmara et al. (2011) não observaram efeito positivo na capacidade antioxidante total nem na qualidade dos espermatozoides congelados com SOD (5, 10 e 20 U/mL), associado a diferentes tempos de equilíbrio na criopreservação do sêmen ovino. Entretanto, Silva et al. (2011) relataram que a adição de SOD (100 UI/mL) preservou o acrossoma de espermatozoides descongelados de carneiros.

Catalase (CAT)

A catalase é uma heme-proteína citoplasmática encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado, que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular, o que decorre de sua ação complementar da SOD. Outra função da catalase é a detoxificação de diferentes substratos, como fenóis e álcoois, via redução acoplada do peróxido de hidrogênio. A catalase expressa seu papel antioxidante, diminuindo o risco de formação do radical hidroxila, a partir do H_2O_2 , via Reação de Fenton, para aumentar sua eficiência e protegê-la da inativação, a catalase, então liga-se à nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidreto NADPH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

A catalase pode ser funcionalmente relevante no trato genital feminino, uma vez que o espermatozoide dos mamíferos possui deficiência em relação à mesma. Além disso, aminoácidos presentes no útero e no oviduto de bovinos estimulam a produção de H_2O_2 pelos espermatozoides mortos. Lapointe e Bilodeau (2003) observaram que a presença de catalase no fluido do oviduto de vacas aumenta, cerca de duas vezes, do início ao final do ciclo estral, principalmente na região da ampola, ressaltando a importância da remoção de H_2O_2 no oviduto.

Câmara et al. (2011) também constataram ação benéfica da adição de CAT (100 e 200 UI/mL) ao diluente Tris-gema, onde observaram redução dos efeitos deletérios da refrigeração na motilidade total dos espermatozoides ovinos mantidos a 5 °C por 24 h, embora nenhum efeito positivo tenha sido observado na funcionalidade das membranas espermáticas. Diversamente, Sicherle et al. (2011) relataram que a adição de 100 UI/mL de catalase no sêmen de carneiros Santa Inês, não foi suficiente para melhorar a cinética espermática e impedir a excessiva produção de ROS, ocasionando assim peroxidação lipídica e fragmentação do DNA, em vista da baixa atividade de catalase influenciada pela produção de ATP e NADPH.

Sistema glutationa/ glutationa redutase (GSH-Px e GSH-Red)

A glutationa peroxidase se apresenta dentro do organismo dos mamíferos em quatro formas (GSH-Px 1, GSH-Px 2, GSH-Px 3, GSH-Px 4), sendo o último responsável pela proteção dos espermatozoides (ALVAREZ et al., 2006). Da mesma forma que a GSH-Red, a GSH – Px é considerada a mais importante na remoção dos peróxidos nas células, sendo responsável pela proteção dos espermatozoides por inibir a peroxidação lipídica e os danos oxidativos (MANEESH; JAYALEKSHMI, 2006).

A GSH-Px atua como um catalisador da redução/degradação do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos (ALVAREZ et al., 2006), juntamente com a SOD, são responsáveis por atuar de como constituintes do sistema antioxidante que protege os espermatozoides de ovinos contra os efeitos das ROS (KASIMANICKAM et al., 2006).

Foote, Brockett e Koproth (2002) e Bucak, Ahin e Yucel (2008) relataram que a adição de GSH em sêmen criopreservado melhorou a motilidade espermática.

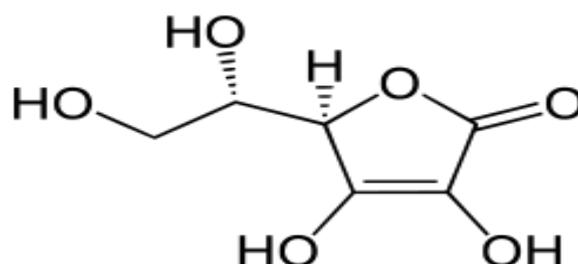
1.5.2. Antioxidantes não-enzimáticos

São conhecidos como antioxidantes sintéticos, um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, ácido α -lipóico (NORDBERG; ARNÉR, 2001), zinco, taurinas, hipotaurinas, glutations, betacaroteno e caroteno (MAIA, 2010). Esse sistema pode atuar em duas linhas: como removedor do agente, antes que ele cause lesão, ou como reparador da lesão ocorrida, exceto a vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, e a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os antioxidantes envolvidos diretamente na reprodução são o ácido ascórbico e Trolox C (análogo da vitamina E).

Ácido ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico encontrado amplamente nas células vegetais e animais pode estar unido a uma proteína e ou na forma livre (COULTATE, 2004). É bastante solúvel em água e pertence a um grupo orgânico chamado de lactonas que são ácidos carboxílicos, bem como apresenta uma estrutura molecular com $C_6H_8O_6$ (Figura 3).

Figura 3: Estrutura molecular do ácido ascórbico (Fonte: Adaptada de Barreiros et al., 2006).



O ácido ascórbico encontra-se disponível para uma oxidação energeticamente favorável, pois apresenta característica hidrossolúvel, neutraliza as espécies de oxigênio reativas (ERO) e atua inibindo a peroxidação lipídica por redução (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006), processo que ocorre na fase aquosa sobre os radicais livres. Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que estes antioxidantes em excesso ou na presença de metais de transição, como o ferro, podem atuar como pró-oxidantes, gerando radicais como o H_2O_2 e o OH^\cdot (RAMALHO; JORGE, 2005).

Coletto (2006) avaliou diferentes níveis de concentração de ácido ascórbico na criopreservação de sêmen de cães e mostrou que a concentração de 1200 μM é eficaz para preservação da motilidade espermática, em outro estudo realizado em cães, Branco et al. (2009) observaram que o uso de ácido ascórbico minimiza os efeitos oxidativos e mantém a integridade do DNA de espermatozoides humano, elevando os níveis de fertilidade.

Castilho et al. (2009) observaram que a utilização de ácido ascórbico na criopreservação de sêmen caprino das raças Saanen e Pardo Alpino, com proporções de 0,05% e 0,25% do antioxidante adicionado em um diluente comercial, mantém a integridade estrutural da membrana dos espermatozoides, bem como a sua viabilidade após ser submetido ao teste de termorresistência.

Sonmez e Demirci (2004) utilizaram ácido ascórbico como antioxidante para promover melhora nas taxas de criopreservação de sêmen ovino, e observaram que a proporção de 5% de glicerol + 1 mg de ácido ascórbico atuou de maneira eficaz na criopreservação do sêmen, gerando maior taxa de motilidade total (51,4%), conservando parte da integridade de membrana acrossomal e apontando maiores índices de espermatozoides viáveis.

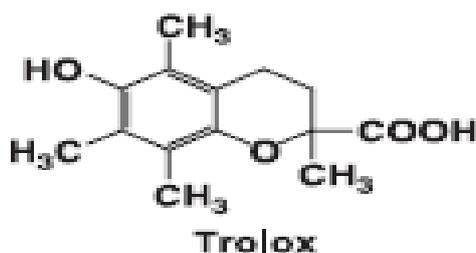
Trolox C (6 – Hidroxi – 2,5,7,8 – tetrametilcroman – 2 – 2 ácido carboxílico)

Sintetizado por Escott e sua equipe em 1974, o Trolox C (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2- ácido carboxílico é um análogo hidrossolúvel do α -tocoferol, indicado para a preservação de óleos e gorduras animal e vegetal com propriedades antioxidantes maiores que o α - e γ -tocoferol. Sabe-se que antioxidantes sintéticos por não conseguirem ser estocados no corpo do

animal, tornan-se menos efetivos que a vitamina E, entretanto, esse análogo é hidrossolúvel, o que oferece a condição necessária para que seja adicionado diretamente na membrana, sem a necessidade de solventes ou outros extratos, capacitando sua eficiência nos sistemas biológicos naturais (BORGES, 2008).

Trata-se de um excelente inibidor da lipoperoxidação devido ao fato de estarem distribuídas em ambas as camadas duplas de lipídeos das biomembranas, pois envolve o OH[•] fenólico e a remoção de radicais peroxil (ALBERTINI e ABUJA, 1999), por obter uma cadeia de carbono e ser composta por um núcleo croman. Sua estrutura molecular se assemelha a do α tocoferol (Figura 4).

Figura 4: Estrutura molecular do Trolox C (6-hidroxi-2,5,7,8-tetra-metil-chroman-2-ácido carboxílico). (Fonte: Adaptada de Rezk et al., 2004).



A sua característica hidrossolúvel ainda lhe confere a possibilidade de agir com maior eficácia que os antioxidantes lipossolúveis, como a vitamina E, pois a maioria das ERO são originadas dentro de uma fase aquosa, permitindo que apenas os radicais peroxil não sejam eliminados pelos antioxidantes hidrossolúveis, desencadeando uma peroxidação lipídica.

Em humanos, Wu et al (1990) utilizaram o Trolox C como antioxidante celular, observando que o mesmo atuou como um removedor de radicais livres, prolongando a vida celular contra os danos oxidativos, em miócitos, hepatócitos e eritrócitos. Silva et al (2011) observaram que a adição de 120 mM Trolox C em sêmen criopreservado de garanhões, não foi suficiente para promover uma melhora dos parâmetros seminais. Entretanto, Marques et al. (2002) observaram que essa substância funciona como agente inibidor de ERO, incrementando a motilidade, viabilidade, e evitando danos ao DNA celular em espermatozoides de equinos.

Coletto (2006) avaliou que a adição de Trolox C na criopreservação de sêmen de cão não determinou aumento de motilidade espermática, mas manteve a integridade do acrossoma espermático o que aumenta a viabilidade das células espermáticas. Peña et al. (2003) por sua vez, demonstraram que o uso de 100 μM e 200 μM de Trolox C em sêmen suíno, proporciona aumento da motilidade progressiva e dos movimentos circulares.

Borges (2008) ao utilizar diluidor acrescido de 200 μM de Trolox C em sêmen bovino, observaram que o uso do antioxidante não melhorou a motilidade espermática e nem proporcionou maior integridade à membrana plasmática; as taxas de viabilidade não diferiram estaticamente do grupo controle, não promovendo, assim, melhores taxas de concepção; além disso, a utilização do Trolox C, neste caso, aumentou a taxa de patologias espermáticas.

Em ovinos, o uso de Trolox C foi eficiente para inibir a liporexidação lipídica da membrana plasmática, no entanto, a adição de 50 μM não foi suficiente para melhorar a motilidade espermática (MAIA, 2009), contrariando resultados de Sarlos et al. (2002), utilizando o sêmen da mesma espécie.

1.6. Atuação dos ERO e antioxidantes na função espermática

O primeiro relato de que o estresse oxidativo poderia afetar a viabilidade e a função espermática foi descrito em 1947, por Macleod, quando observou que o espermatozoide humano perdia rapidamente sua motilidade ao ser incubado e submetido a concentrações de O_2 , e que a adição de catalase oferecia alguma proteção (HALLIWELI; GUTTERIDGE, 1999).

Tais danos oxidativos causados às células são decorrentes do desequilíbrio entre as concentrações fisiológicas de oxidantes e antioxidantes, aliado a rica quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana dos espermatozoides dos mamíferos, tornando-a susceptível à peroxidação lipídica e ao ataque das ERO, reduzindo assim a capacidade antioxidante total do sêmen, bem como a qualidade do mesmo (GUERRA; EVANS; MAXWELL, 2004; BUCAK et al., 2007).

1.6.1. Produção de ERO no sêmen

Sabe-se que o mecanismo responsável pela produção das ERO ainda não está elucidado (MAIA; BICUDO, 2009), entretanto, algumas hipóteses são lançadas, pois a formação dos oxidantes tem sido intrínseca aos espermatozoides, onde os mesmos possuem sistemas produtores de ERO na membrana plasmática pelo sistema NADPH – oxidase; e nas mitocôndrias, pela NADP oxidase dependente (GUERRA; EVANS; MAXWELL, 2004).

Ainda na década de 90, Aitken et al. (1995) descreveram que há evidências da presença de uma oxidase na membrana plasmática do espermatozoide que, quando ativa, gera O_2^- , sugerindo ainda que a nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) seja a principal fonte de elétrons responsáveis pela produção de O_2^- pelo espermatozoide humano, com o possível envolvimento do sistema NADPH oxidase, como acontece em outros tipos de células.

Avaliando sêmen de equinos, Sauber e Ball (2006) confirmaram que espermatozoides dessa espécie usam NADPH como substrato para geração de superóxido. Por outro lado, De Lamirande e Lamothe (2009) relataram que, em sêmen humano, a enzima espermática não é similar a NADPH – oxidase, pois os componentes dessa oxidase não foram encontrados quando submetidos à análise, entretanto sugeriram que outra oxidase não identificada está presente na membrana, tornando-se responsável pela produção de superóxido no espermatozoides.

Outra hipótese para produção de ERO seria através da diaforase espermática, integrada a cadeia respiratória mitocondrial e localizada na peça intermediária do espermatozoides (GAVELLA; LIPOVAC, 1992). Há uma predominância da diaforese espermática como sistema gerador de ERO pelo espermatozoide e o sistema mitocondrial é a maior fonte intracelular desses oxidantes, principalmente em espermatozoides de reprodutores inférteis (SANOCKA; KURPISZ, 2004).

As principais fontes de ERO do ejaculado estão nos espermatozoides, principalmente nos imaturos e morfologicamente anormais, pois geram maiores quantidades de ERO do que os normais (GIL-GUZMAN et al., 2001; MAIA;

BICUDO, 2009), bem como nos leucócitos que podem estar presentes no ejaculado (SANOOCKA; KURPISZ, 2004; MARCHESI; FENG, 2007) gerando cem vezes mais ERO que as células espermáticas (MAIA, et al., 2010). Baumber et al. (2002), ao incubarem espermatozoides de garanhão, na presença ou não de neutrófilos, observaram que os leucócitos presentes tornam-se, potencialmente, perigosos, sendo fonte de ERO, podendo causar um efeito prejudicial na função espermática.

Em sêmen de ovinos criopreservado aditivado, ou não com Trolox C e catalase, Maia et al. (2010) relatou a geração de oxidantes como: superóxido dismutase, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, através da lipoperoxidação, em sêmen congelado com ou sem antioxidantes, sugerindo que o processo de criopreservação induz a formação de ERO na espécie.

1.6.2. ERO e a capacitação espermática

Estudos vêm demonstrando evidências de que a capacitação espermática é um processo oxidativo, onde pequenas quantidades de ERO, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, são necessárias, para que ocorra a capacitação espermática, e a reação acrossomal, proporcionando capacidade de fecundação ao espermatozoides (BAUMBER et al., 2003; O'FLAHERTY et al., 2003).

De Lamirande e Lamonthé (2009) descreveram que tanto o superóxido (O_2^-) quanto o óxido nítrico (NO^\bullet) estão envolvidos na capacitação do espermatozoides humano, e que há uma diferença entre essas duas ERO quanto ao período de tempo em que elas são necessárias, sendo O_2^- para os primeiros 30 minutos, e o NO^\bullet por mais de duas horas.

O'flaherty, BEORLEGUI; BECONI, (2003) avaliaram o envolvimento do H_2O_2 no espermatozoides bovino após induzir a capacitação do mesmo na presença de heparina com adição de várias concentrações de catalase (10 a 100 $\mu g/mL$), podendo observar que os níveis de H_2O_2 foram positivos ($P < 0,05$) nos espermatozoides induzidos a capacitação do que no controle. Entretanto a adição de catalase, removedor de H_2O_2 , não ocasionou nenhuma diferença ($P > 0,05$) na porcentagem dos espermatozoides capacitados, porém, após

adicionar SOD ao meio pode-se observar inibição da capacitação, como a SOD é um removedor de O_2^- , é possível afirmar que o superóxido dismutase é a ERO envolvida no mecanismo de capacitação espermática do espermatozoides bovino.

Maia et al. (2006), ao avaliar a geração de ERO e viabilidade espermática no sêmen de carneiro congelado com diferentes doses de antioxidantes, observaram que as concentrações de H_2O_2 gerados no sêmen com catalase foram semelhantes ao do controle não havendo nenhum efeito negativo na integridade da membrana plasmática e acrossomal, relatando a importância do peróxido de hidrogênio na capacitação espermática dessa espécie. Resultado semelhante foi obtido por Baumber et al. (2003), ao incubarem sêmen equino na presença do sistema gerador de O_2^- e/ou H_2O_2 xantina – xantina oxidase (X-XO), com e sem catalase, onde a geração de ERO não teve nenhum efeito na porcentagem de espermatozoides vivos com membrana intacta, independente da adição de catalase, quando comparado ao grupo controle.

1.6.3. Danos causados ao espermatozoides pelas ERO

Embora as concentrações controladas das ERO sejam necessárias para o desenvolvimento de algumas funções fisiológicas em diferentes tipos celulares, seu excesso prejudica a motilidade, viabilidade e função espermática, através da interação com lipídeos da membrana, proteínas, DNA mitocondrial e nuclear (GUERRA; EVANS; MAXWELL, 2004; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Tais danos celulares podem ser aumentados e/ou acelerados quando os espermatozoides do ejaculado de diferentes espécies são submetidos ao processo de criopreservação (AZEVEDO, 2006; RODELLO, 2006; MAIA, 2006; MAHFOUZ et al, 2010).

Esses distúrbios no balanço oxidante-antioxidante, em favor do oxidante, favorecem ao estresse oxidativo, que inicialmente, pode ser causado por redução na quantidade de antioxidantes e sistemas de defesa celular ou por produção elevada de ERO (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Alguns estudos relataram que a ocorrência de decréscimo no metabolismo de energia do espermatozoides, na motilidade, viabilidade

espermática e na fragmentação do DNA proporciona em várias espécies, com a equina (ARMSTRONG et al., 1999), ovina (KRZYOSIAK et al., 2000), bovina (DURU; MURSHFOI; OFHNINGER, 2000) e humana (BILODEAU et al., 2002), a geração de altas concentrações de ERO. Sicherle et al (2006) avaliaram a adição de diferentes concentrações de Trolox C (50, 100, 150 e 200 mM) em sêmen de carneiro e relataram que a utilização de 100 mM do composto Trolox C promoveu um efeito deletério sobre a mortalidade espermática, devido a produção elevada de ERO. Peris, Bilodeau e Dufour. (2007) observaram resultados semelhantes ao avaliarem os parâmetros seminais (motilidade) de carneiros, os quais apresentaram danos oxidativos nas células espermáticas.

Silva, (2010) observou efeito deletério na motilidade progressiva, vigor e membrana plasmática de espermatozoides de ovino aditivados com etileno glicol (3 e 5%) e acetamida (2 e 7%), submetidos a criopreservação, a partir da presença de ERO. Baumber et al. (2002) observaram, uma influência negativa das ERO, geradas por neutrófilos ativados sobre a motilidade do espermatozoides equino, havendo um declínio significativo no total de espermatozoides móveis e na motilidade progressiva.

Sircherle et al. (2011), ao adicionar os antioxidantes Trolox C e catalase em sêmen de ovino incubado, observaram que os aditivos não conseguiram inibir a alta produção de ERO após o descongelamento do sêmen, provocando a lipoperoxidação lipídica, fragmentação do DNA e queda de motilidade devido o decréscimo na produção de ATP e NADPH.

1.6.4. Efeitos do uso de antioxidantes sobre a viabilidade

A adição de antioxidantes ao diluente vem sendo testada por vários pesquisadores, com intuito de promover proteção ao espermatozoides dos efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio e minimizar as crioinjúrias decorrentes do processo e criopreservação (HOLT, 2000; WATSON, 2000) que promovem redução da motilidade, da integridade morfológica dos espermatozoides e, conseqüentemente, da fertilidade (SALAMON; MAXWELL, 1995).

Krzyzosiak et al. (2000) também observaram um efeito benéfico da adição de Catalase ao diluente, na sobrevivência, motilidade e na viabilidade

do espermatozoides bovino. Bilodeau et al. (2002) observaram que a adição de pequenas quantidades de catalase (1 a 5 U/mL) foi suficiente para proteger o espermatozoides bovino dos danos causados pelo H₂O₂ à sua motilidade.

Silva et al (2008), avaliaram a adição de diferentes dosagens de piruvato de sódio e Trolox C ao diluidor, em sêmen congelado de garanhões, relatando que houve uma melhora (P<0,05) da motilidade progressiva e da integridade do DNA do espermatozoides, porém na associação de piruvato ao Trolox C não houve melhoras dos parâmetros seminais. Resultados semelhantes foram encontrados por Atessahin et al. (2008), em espermatozoides de bodes da raça Angorá submetidos a criopreservação, onde observaram aumento da motilidade progressiva ao utilizarem 15 mM de cisteína.

Trabalhando com sêmen de carneiros, Sarlos et al. (2002) avaliaram o efeito dos antioxidantes: acetato de α -tocoferol, glutationa peroxidase, aromex, resveratrol e da associação de resveratrol + vitamina E ou resveratrol + aromex, na motilidade e integridade das membranas espermáticas. Estes autores observaram que a adição de antioxidantes prolonga o período de conservação do sêmen, melhora a motilidade do espermatozoides e reduz o grau de danos celulares.

Coyan et al. (2010) realizaram o primeiro estudo utilizando metionina como antioxidantes em sêmen de carneiro a 5°C e relataram que foi possível melhorar, significativamente, a motilidade espermática utilizando uma dose de 1 mM, após 72 horas de armazenamento. Tais efeitos são explicados devido a metionina ser precursora da glutationa, o que gerou seu aumento no meio em 72 horas de armazenamento, favorecendo melhora na motilidade.

Bucak e Tekin (2007), ao avaliarem o efeito da adição trealose (50 mM) e glutationa (5 ou 10 mM) em sêmen diluído com tris-gema, relataram que a utilização de ambos demonstrou melhora significativa na proteção do espermatozoides como por exemplo, motilidade, viabilidade e estabilização da membrana de espermatozoides submetidos a técnica de criopreservação.

Tilburg et al. (2008) promoveram um estudo para avaliar a influência da insulina em sêmen criopreservado de carneiro e observaram a aumento da motilidade espermática, devido ao aumento da captação de glicose pelas células espermáticas, gerado pela maior concentração de insulina. Tal trabalho

também evidenciou que os parâmetros de retilinearidade, linearidade e frequência da batida do flagelo aumentaram significativamente em níveis de 0,3; 3 e 0,003 $\mu\text{M}/\text{UI}$ de insulina/mL, respectivamente. Os autores também observaram que o uso de insulina proporcionou a manutenção da integridade acrossomal no espermatozoides de carneiros.

1.7. Avaliação da fertilidade do sêmen

Tradicionalmente, a avaliação da fertilidade do sêmen de um reprodutor era feita apenas com bases descritivas, evidenciando o número de espermatozoides presentes no ejaculado, sua motilidade e morfologia. No entanto, estudos têm demonstrado que esse conceito é falho, uma vez que, o número de espermatozoides móveis ou morfologicamente normais garantem apenas sua competência funcional, e não a fertilidade do ejaculado.

Comumente a motilidade espermática é obtida de maneira subjetiva, através de análise sob microscopia óptica, entretanto pesquisas apontam que este tipo de avaliação manual é impreciso, mesmo quando realizada por técnicos experientes, devido a influência de uma série de variações entre observações e observadores (ARRUDA et al., 2003a; ARRUDA et al., 2003b).

Visando reduzir estas variações ocorrentes, o sistema de avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides tem sido reportado, uma vez que, a cinética espermática é um fator relevante na determinação do potencial de fecundidade dos espermatozoides, tornando a avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides de suma importância, uma vez que, oferece maior confiabilidade nos parâmetros avaliados, os quais têm sido correlacionados com provas de capacidade fecundante em testes *in vitro* (JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, 2001).

Todavia, apenas a motilidade espermática não é capaz de explicar as diferenças entre o grau de fecundidade dos machos, pois, para atingir o excelente grau de fecundidade o espermatozoide deve possuir a capacidade de transpor parte do trato reprodutivo da fêmea até de ligar-se a zona pelúcida, sofrer reação acrossomal, penetrar na zona pelúcida e finalmente ligar-se a membrana do oócito, para que o mesmo seja ativado e inicie seu

desenvolvimento, a deficiência em qualquer dessas etapas reduz a capacidade de fecundidade do espermatozoide.

Com base nesta nova ótica de avaliação, novos testes complementares têm sido instituídos para avaliar com maior acurácia a capacidade fecundante do espermatozoide *in vitro* e *in vivo*, no entanto nenhum teste laboratorial isolado pode prever o potencial de fecundidade do ejaculado. Além disso, algumas técnicas de avaliações complementares do sêmen por vezes têm sua aplicabilidade reduzida em detrimento da baixa repetibilidade dos testes, relação entre as características quantitativas e qualitativas na dose inseminante, manipulação do ejaculado e sua possível injúria, manutenção no trato genital feminino, fecundação e desenvolvimento embrionário (CORREA; PACE; ZAVOS, 1997).

Contudo, dentre a grande diversidade de biotécnicas que vem sendo desenvolvida para a avaliação seminal, podemos incluir a avaliação computadorizada de sêmen, que viabiliza a visualização de diversas características do movimento espermático, os testes de integridade de membrana plasmática e acrossomal, o potencial de atividade mitocondrial e o teste de ligação do espermatozoide a membrana perivitelina da gema do ovo, como um importante conjunto de métodos possam prever a capacidade de fertilidade do sêmen.

1.8. Integridade das membranas

A avaliação dos espermatozoides por técnicas que apresentem maior confiabilidade, objetividade e repetibilidade é de suma importância, entre as várias formas de avaliação de integridade e função de compartimentos específicos da célula espermática, grande ênfase tem sido dada ao uso de sondas fluorescentes. A fluorescência é um indicador sensível e específico do estado de determinadas moléculas, podendo ser aplicada como um meio de medir as mudanças metabólicas dentro de células vivas, estas diferenças em afinidade das sondas fluorescentes por certas regiões do espermatozoide provavelmente é resultado de interações da célula com os lipídios e proteínas que estão distribuídos de maneira heterogênea por toda a membrana (EDDY; O'BRIEN, 1994; HAUGLAND, 2001).

A realização da análise laboratorial da integridade espermática é fundamental em programas de pesquisa e tecnologia de sêmen, sendo uma ferramenta essencial para a avaliação da função celular. Sondas fluorescentes supravitais como iodeto de propídeo (PI) e Hoechst 33342 são utilizadas para avaliar a integridade de membrana plasmática do espermatozoide, o iodeto de propídeo vem sendo utilizado em larga escala e apresentando bons resultados tanto por microscopia com fluorescência como em sistema de citometria de fluxo, possui afinidade ao DNA e cora em vermelho as células que apresentarem danos em sua membrana plasmática (GRAHAM; KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990; SALAMON; MAXWELL, 1995; ARRUDA et al., 2003a; CELEGHINI, 2005). Graham et al. (1990) ao testarem a eficiência do PI em avaliação de integridade de membrana plasmática no sêmen congelado de touros observaram uma nível de confiabilidade de 95%, indicando que o PI é um corante supravital confiável na avaliação de espermatozoides bovinos.

O corante Hoechst 33342 por sua vez, ao verificar a integridade de membrana plasmática do espermatozoide liga-se especificamente ao DNA e marca o núcleo da célula em azul, e por ter a capacidade de atravessar membrana plasmática intacta, atua como marcador das células não lesadas, podendo atuar de forma associada com outra sonda de coloração distinta, como por exemplo, o PI (SALAMON; MAXWELL, 2000).

A integridade acrossomal é outro parâmetro importante na morfologia espermática, pois o processo de criopreservação pode antecipar o desencadeamento da reação acrossômica. Dentre as diferentes técnicas utilizadas para avaliação da integridade acrossomal as aglutininas como, aglutinina *Pisum sativum* (PSA), aglutinina de *Ricinus communis* (RCA) e Aglutinina *Arachis hypogea* (PNA) as lectinas de leguminosas, uma das famílias de proteínas vegetais mais estudadas, mostram uma ampla abrangência em suas especificidades por carboidratos. O reconhecimento específico de carboidratos pelas lectinas é crítico para as interações celulares e, por isso, tem implicações em diversas áreas da biologia e da medicina (KUMAR et al., 1999).

Estas sondas produzem uma marcação uniforme do capuz acrossomal nas células que não tiveram o acrossoma reagido e uma banda fluorescente ao redor do segmento equatorial do espermatozoide que tenha sofrido reação

acrossomal, uma vez que, o caráter glicoproteico dos componentes acrossomais fornece especificidade a glicoproteínas da membrana acrossomal, sendo normalmente utilizado para esse tipo de análise a conjugação entre estas aglutininas a fluoresceínas, como o isotiocionato de fluoresceínas (FITC), para que seja possível a visualização da membrana acrossomal em microscopia de fluorescência (FARLIN et al., 1992; CELEGHINI, 2005).

A aglutinina do amendoim (PNA) é uma lectina vegetal não glicolisada composta de quatro subunidades idênticas de 27 kDa. O PNA é oriundo do amendoim, se liga a galactose, presente na membrana acrossômica externa, não se ligando a membrana plasmática (ZEGINIADOU; PAPADIMAS; MANTALENARIS, 2000). Quando o FITC-PNA é utilizado para a avaliação da integridade do acrossoma, este agente se liga a β -galactose associada à pequena porção da membrana acrossomal externa de espermatozoides portadores de acrossoma intacto, corando-os com uma fluorescência verde brilhante (ROTH et al., 1998). Já em acrossomas reagidos e/ou com áreas danificadas na membrana acrossomal, o corante não consegue ligar-se a β -galactose, marcando apenas a região equatorial da cabeça em verde fluorescentes ou mantendo toda a extensão da cabeça de forma incolor (ROTH et al., 1998; GRAHAM, 2001).

De maneira inversa FITC-PSA para a avaliação da integridade do acrossoma, os espermatozoides que possuem sua membrana integra não são corados, devido à ausência de contato efetivo entre a sonda fluorescente com o conteúdo acrossomal, uma vez que está aglutinina não é permeável a membrana acrossomal. Por outro lado, em células espermática que apresentam acrossoma danificado, o FITC-PSA entra em contato com o conteúdo acrossomal e se liga a α -manose e a α -galactose da matriz acrossomal, corando esta região em verde amarelado fluorescente (ARRUDA et al., 2007; CELEGHINI, 2005).

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial é fundamental para a interpretação de mudanças na fisiologia celular em várias situações, tem como principal finalidade predizer o risco da célula espermática sofrer apoptose, pois o comprometimento deste parâmetro deve ser encarado como primeiro sinal de estresse, induzido pela elevação da concentração de espécies

reativas de oxigênio (ERO), comprometendo o metabolismo normal celular (MARCHESI; FENG, 2007).

O ATP produzido pelas mitocôndrias é gerenciado pelo potencial de membrana mitocondrial interno gerado pela cadeia respiratória, este ATP produzido pelas mitocôndrias atuam como suplemento energético para ocorrência dos batimentos flagelares, tornando indispensável a produção de ATP, para que ocorra a motilidade espermática (DUCHEN et al., 1993). Desta forma inúmeros marcadores para o monitoramento do potencial mitocondrial de membrana têm sido pesquisados, dando ênfase ao uso das sondas fluorescentes, como o Rhodamine 123 (GRAHAM, 2001; AURICH, 2005), MITO (SILVA et al., 2009) e o 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianine iodide (JC-1) são utilizados para o monitoramento do potencial de membrana mitocondrial (AURICH, 2005).

A rodamina 123 (R123), que é um fluorocromo capaz de marcar mitocôndrias em células vivas, emitindo fluorescência verde a 515-575 nm, tem sido utilizada para análise da função mitocondrial dos espermatozoides, devido ao fato de ser uma sonda seletiva de membranas funcionais, cujo princípio de atuação está baseado na formação do gradiente de próton na membrana mitocondrial interna (SILVA e GADELLA, 2006).

Graham, Kunze e Hammesstedt. (1990) confirmaram que a sonda R123 pode ser utilizada para avaliação da mitocôndria funcional das células espermáticas, após observarem que o corante R123 acumulou-se e foi retido intensamente em mitocôndria funcional de espermatozoide bovino, identificando ainda que a função mitocondrial, mensurada pela fluorescência emitida por R123, foi deprimida por inibidores de mitocôndrias (rotenona e monensina), dando condição de detectar os danos mitocondriais por esta sonda.

1.9. Avaliação da fecundação *in vitro*

A capacidade da célula espermática ligar-se a zona pelúcida *in vitro*, avalia a eficácia (concentração e capacidade) de receptores de espermatozoides ligarem-se ao oócito (MORAES et al., 2010). Observando os eventos primordiais para que ocorra a fecundação (GRAHAM, 1996) podemos

mencionar que a capacidade de ligação dos espermatozoides a zona pelúcida seja um importante atributo a ser considerado, num período que compreenda desde a capacitação espermática até a fertilização do oócito. Este tipo de avaliação já tem sido reportado em espermatozoides de seres humanos, touros, porcos, garranhões e outras espécies, porém a necessidade de obtenção de um grande número de ovários para este tipo de avaliação inviabiliza a realização corriqueira da técnica.

Sendo assim, outras alternativas de avaliação de fertilidade *in vitro* tem sido desenvolvidas, como por exemplo, a atualização da membrana perivitelina da gema de ovo da galinha, uma vez que as semelhanças moleculares entre essa e a zona pelúcida de algumas espécies dão condições para realização de testes de fertilidade *in vitro* (MORAES, 2010). Além disso, a membrana perivitelina da gema de ovo por ser uma matéria-prima abundante e de fácil manipulação, o que facilita a realização de vários ensaios *in vitro* (Graham; Moce, 2005), tornando-se uma ferramenta importante para o desenvolvimento de novos ou melhores testes de avaliação de fertilidade, que unam a praticidade com a confiabilidade de resultados.

2. JUSTIFICATIVA

A utilização de sêmen criopreservado durante a inseminação artificial merece destaque, uma vez que, favorece a multiplicação de animais geneticamente superiores, auxilia na preservação de raças nativas e em risco de extinção, além de ser uma técnica simples e com custo baixo, quando comparada às demais biotécnicas.

No entanto, alguns entraves decorrentes do uso destas biotécnicas ainda precisam ser solucionados. A exemplo disso, são os baixos índices de fertilidade quando do uso do sêmen congelado-descongelado. Sendo assim faz-se necessário estudos quanto a compreensão do eventos metabólicos e fisiológicos necessários para a capacitação e fecundação espermática, visando reduzir os estresse oxidativo, bem como os danos ocasionados ao espermatozoide durante o processo de congelamento-descongelamento.

Neste contexto, a adição de antioxidantes ao meio diluidor visa tentar resolver este impasse, a fim de permitir alcançar taxas de fecundidade mais elevadas, melhorando assim os índices reprodutivos do rebanho ovino como um todo. Os antioxidantes atuam na prevenção da oxidação das células, as quais possuem um mecanismo de defesa que atua como detoxificador do agente oxirredutor, ou como responsável na reparação da lesão ocorrida, inibindo ou minimizando a exacerbada produção das ERO no processo de criopreservação, sem alterar a viabilidade espermática (GUERRA et al., 2012).

Dentre os antioxidantes enzimáticos o ácido ascórbico e o Trolox C (análogo da vitamina E) merecem destaque quanto a sua utilização. Uma vez que, a adição de ácido ascórbico ao diluente minimiza os efeitos oxidativos, mantendo a integridade do DNA do espermatozoide, elevando assim os níveis de fertilidade (BRANCO et al., 2009). Marques et al. (2002) observaram que ao adicionarem Trolox C ao sêmen diluído de equinos, o mesmo atuou como agente inibidor de ERO, pois proporcionou incremento da motilidade e viabilidade espermática, e redução dos danos ao DNA da célula espermática.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações dos antioxidantes no sêmen fresco de carneiros antes da criopreservação sobre a qualidade espermática após descongelamento.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de Trolox C e ácido ascórbico no sêmen fresco de carneiros antes da criopreservação sobre:
 - a motilidade do espermatozoides descongelados;
 - a integridade das membranas plasmática e acrossomal;
 - o potencial de atividade mitocondrial; e
 - a capacidade de ligação dos espermatozoides descongelados na membrana perivitelina da gema de ovo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Toda e qualquer manipulação com os animais experimentais e às práticas de execução do experimento respeitaram os princípios éticos da experimentação animal do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Universidade Federal do Vale do São Francisco/Univasf, sob o protocolo de número 0005/140813.

4.2 Local de execução

As atividades experimentais foram realizadas nas instalações do Setor de Caprinovinocultura e no Centro de Pesquisa em Suínos, Espécies Nativas e Silvestres (CPSENS) da Univasf, situados no município de Petrolina, Estado de Pernambuco. O município está localizado a uma latitude 09°23'55" Sul e a uma longitude 40°30'03" Oeste, estando a uma altitude de 376 metros, com precipitação média anual em torno de 500 mm.

4.3 Animais experimentais e coleta de sêmen

Foram utilizados três ovinos, sendo dois da raça Dorper e um da raça Santa Inês, com idade entre 12 e 36 meses, mantidos em um sistema de confinamento, em baias individuais. As dietas eram compostas de capim elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) como volumoso e concentrado à base de farelo de milho, farelo de soja, complementada com mistura mineral (NRC, 2000), com fornecimento de água à vontade.

Foram realizadas 10 coletas de cada carneiro por meio de vagina artificial, na presença de uma fêmea ovina em estro natural ou induzido, entre os meses de maio a julho de 2014.

4.4 Avaliações do sêmen fresco

Após a coleta, o sêmen era mantido em banho-maria a 32°C e, imediatamente, avaliado quanto ao volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade e concentração espermática. O aspecto e o volume eram avaliados diretamente no tubo coletor.

Avaliação computadorizada da motilidade espermática

Para avaliar a motilidade total e progressiva de sêmen, 8 µL do sêmen fresco foi diluído em 400 mL de Tris e avaliado no Sistema de Análise Computadorizada de Sêmen (CASA; Minitub®, Berlim, Alemanha), em placa aquecida a 37°C, em cada amostra foram avaliados cinco campos escolhidos aleatoriamente. Apenas sêmen com motilidade $\geq 70\%$ foram utilizados.

Avaliação da Concentração Espermática

Para determinar a concentração espermática uma alíquota de 4 µL de sêmen foi diluído em 4 mL de água destilada em microcuvetas próprias para o fotômetro SpermaCue (SDM6; Minitub®; Berlim, Alemanha), devidamente calibrado para sêmen de ovinos. Em seguida procedia-se a leitura automatizada, para obter a taxa de diluição para a concentração de 200×10^6 de espermatozoides/mL (Figura 5).

Figura 5. Fotômetro SpermaCue para determinar a concentração espermática.



Fonte: Arquivo Pessoal.

4.5 Diluição e Criopreservação do Sêmen

A quantidade de antioxidantes a ser acrescentado no sêmen diluído foi calculada de acordo com o número de palhetas a serem congeladas para cada tratamento, reduzindo o volume total do diluente Tris-gema de ovo (Anexo A).

Para a utilização do antioxidante Trolox C foi necessário realizar o preparo da solução estoque (Anexo B), conforme descrito por Maia (2006). As concentrações de ácido ascórbico eram preparadas nos dias de coleta.

A diluição foi realizada com o diluente Tris-Gema de ovo, conforme Souza et al. (2014), e em seguida os ejaculados foram subdivididos em 5 tubos de ensaio (5 mL) e as seguintes concentrações de antioxidantes foram adicionadas:

- Controle, sem antioxidante;
- 100 µL de Trolox C¹ (TRO100);
- 200 µL Trolox C (TRO200);
- 0,05% de Ácido Ascórbico² (AA0,05); e
- 0,25% Ácido Ascórbico (AA0,25).

Após a diluição, as amostras tratadas foram colocadas dentro de becker com água a 32°C, e acondicionados em câmara fria a 5°C durante 2 horas (taxa de resfriamento foi de 0,25°C/min). Depois, as amostras foram levemente homogeneizadas, envasadas em palhetas de 0,5 mL e lacradas com seladora UltraSeal (Minitub®; Berlim, Alemanha). As palhetas foram acondicionadas a 8 cm da lâmina de nitrogênio líquido (N₂) durante 15 minutos, e em seguida submersas em N₂ para serem armazenadas em botijão criogênico.

4.6 Avaliações dos tratamentos

As amostras de cada tratamento foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos, utilizando descongelador de palheta automático (IMV Technologies, SP, Brasil), e acondicionado em microtubos (1,5 mL), em banho-maria a 37°C até a realização das avaliações.

¹ 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2 carboxylic acid, (53188-07-1) Sigma Aldrich.

² C₆H₈O₆, (A92902) c/ 176.12 g/mol, Sigma Aldrich.

4.6.1 Avaliação da motilidade espermática

A avaliação da motilidade total e progressiva dos espermatozoides foi realizada através do CASA, conforme descrita anteriormente.

4.6.2 Avaliação da integridade da membrana plasmática

A avaliação da integridade da membrana plasmática (iMP) foi realizada conforme descrita por Azevedo (2006), onde 5 μL do sêmen descongelado (2×10^6 espermatozoides) foi colocado em outro microtubo e adicionado 120 μL de Tris, 2 μL de PI e Hoechst 33342 (1 mg/mL em PBS). Em seguida, foi homogeneizada, mantida protegida da luz e incubada a 37°C durante 8 minutos. Após este tempo, 10 μL foi retirado, colocado entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C e avaliada em microscópio de fluorescência (AXIO Image A2; Carl Zeiss®, Berlim, Alemanha), utilizando filtro de fluoresceína de excitação de 365nm e de emissão de 420nm, onde foram contados 200 espermatozoides em campos aleatórios da lâmina.

As células coradas foram visualizadas e classificadas baseado na classificação de Celeghini (2005): 1) ausência de fluorescência azul (Hoechst 33342) e presença de fluorescência vermelha (PI) na cabeça do espermatozoide indica que há lesão na membrana plasmática; e 2) presença de fluorescência azul (Hoechst 33342) e ausência de fluorescência vermelha (PI) na cabeça do espermatozoide, indica que a membrana plasmática encontra-se íntegra.

A coloração fluorescente dos espermatozoides foi fotografada utilizando a câmara Zeiss Axiophot acoplada ao microscópio.

4.6.3 Avaliação da integridade da membrana acrossomal

Para avaliar a integridade da membrana do acrossoma (iAC) foram preparados esfregaços com 10 μL de sêmen de cada tratamento, que foram, protegidos da luz, secos em temperatura ambiente e armazenados a 4°C. Após duas semanas, os esfregaços foram corados com 30 μL de FITC-PNA (100

µg/mL), incubados durante 20 minutos em câmara úmida a 4°C, lavados depois em PBS e secos na ausência da luz.

Antes da avaliação dos esfregaços, 5 µL de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de fenilenediamine) foi adicionado sobre o esfregaço de cada lâmina e depois coberta com lamínula (ROTH et al.1998). O total de 200 células foi avaliado em microscópio de fluorescência (AXIO Image A2; Carl Zeiss®, Berlim, Alemanha), utilizando filtro de fluoresceína de excitação de 365 nm e de emissão de 420 nm, onde foram contados 200 espermatozoides em campos aleatórios da lâmina. Os espermatozoides foram classificados da seguinte forma, no aumento de 400x: a) com acrossoma integro, quando apresentavam a região acrossomal corada de verde brilhante; b) com acrossoma reagido/lesado, quando apresentavam uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda a cabeça.

4.6.4 Avaliação da atividade mitocondrial

Para avaliar a atividade mitocondrial (AM) da cauda dos espermatozoides foi realizada conforme descrita por Celeghini (2005), com modificações. Alíquota de 5 µL (2×10^6 espermatozoides) de cada tratamento foi diluída com 120 µL de Tris, onde foram adicionadas 2 µL de Rodamina 123 (R123) e 2 µL de PI. A utilização do PI foi necessária, para identificar os espermatozoides com ausência de atividade mitocondrial, uma vez que, estes se apresentavam incolor, desta forma, o PI deixou de cor vermelha a cabeça do espermatozoide.

Após homogeneizar a amostra, ela foi incubada a 37°C durante 20 minutos, sobre abrigo da luz, depois 10 µL foi retirado, colocado entre lâmina e lamínula pré aquecidas e avaliados em microscópio de fluorescência (AXIO Image A2; Carl Zeiss®, Berlim, Alemanha), utilizando filtro de fluoresceína de excitação de 400 a 570 nm e de emissão de 460 a 610 nm, em aumento de 400x. Foram contados 200 espermatozoides em campos aleatórios da lâmina, onde os espermatozoides corados foram visualizados e classificados da seguinte forma: a) ausência de atividade mitocondrial, quando não havia fluorescência verde (R123) na cauda do espermatozoide; b) presença de

atividade mitocondrial, quando havia fluorescência verde na cauda do espermatozoide.

4.6.5 Teste de ligação

Preparação da membrana perivitelina

A capacidade de se ligarem a membrana perivitelina da gema de ovo dos espermatozoide descongelados foi realizada conforme descrito por Amorim et al. (2007). As membranas perivitelinas (MPVs) a serem usadas foram preparadas retirando a gema de ovo da clara, em seguida removeu-se o excesso da clara da gema de ovo com papel toalha (marca Snob). A gema de ovo intacta foi colocada sobre um pedaço de parafilme, antes do rompimento da mesma, e depois a membrana da gema de ovo remanescente foi gentilmente lavada com diluente TALP (GRAHAM,1996). Antes da membrana da gema de ovo ser removida do parafilme, ela foi cortada com tesoura para abri-la, e então colocada na placa de petri de vidro contendo TALP para ser lavada várias vezes com TALP até a mesma não conter mais resíduo de gema.

A MPV foi cortada em pequenos fragmentos (1x1 cm), utilizando uma cubeta de espectrofotômetro e uma lâmina de bisturi ainda dentro da placa de petri e com TALP. Cada fragmento da MPV foi imerso em 1 mL de TALP em tubos de ensaio de 4 mL.

Ensaio de ligação a MPV in vitro

Para realizar o teste de ligação, cada MPV foi inseminada com 50.000 espermatozoides descongelados de cada tratamento.

As membranas e os espermatozoides foram incubados a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂ no ar durante 90 minutos, onde os tubos foram agitados gentilmente a cada 30 minutos para manter a membrana aberta em contato com os espermatozoides. Vinte minutos antes do final do tempo de incubação, 10 µL de Hoechst 33342 (1 mg/ml em PBS) foi adicionado em cada tubo, a fim de permitir visualizar os espermatozoides ligados a MPV no microscópio de fluorescência (AXIO Image A2; Carl Zeiss®, Berlim, Alemanha).

Após a incubação, as MPV foram retiradas dos tubos e colocada em outro tubo contendo 1 mL de TALP, e lavada mais 5 vezes para remover aqueles espermatozoides que não se ligaram. Depois, cada MPV foi aberta em lâmina e coberta com lamínulas e avaliadas em microscópio de fluorescência usando um filtro de excitação com 365 nm e de emissão com 420 nm, em aumento de 400x.

O número de espermatozoides ligados à MPV foram contados em 6 campos aleatórios observado, e registrado. O número relativo de espermatozoides ligados por membrana para cada tratamento foi calculado, pela divisão do número total de espermatozoides ligados a MPV pelo número de espermatozoides ligados à do controle.

4.7 Análise estatística

Os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas ao teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS 9.2 2002-2008 by SAS Institute Inc. (Cary, NC, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Motilidade espermática

A motilidade total espermática foi maior para nos espermatozoides que foram tratados com 0,25% de ácido ascórbico (AA0,25) e 200 µL de Trolox C (TRO200) do que TRO100, AA0,05 e controle (Tabela 1; $P < 0,05$).

Todas as amostras de sêmen tratadas com antioxidantes (TRO100; TRO200; AA0,05; e AA0,25) apresentaram a motilidade progressiva espermática maior que o controle (Tabela 1; $P < 0,05$).

Tabela 1. Motilidade total e progressiva (%) de espermatozoides descongelados de carneiros tratados ou não com diferentes concentrações de antioxidantes antes da criopreservação (Média±DP)

(%)	Controle	Trolox C		Ácido Ascórbico	
		TRO100	TRO200	AA0,05	AA0,25
MT	59,80± 1,9 ^c	61,99±1,92 ^{bc}	64,33±1,9 ^a	62,82±1,92 ^{bc}	64,48±1,9 ^a
MP	39,57±2,68 ^b	42,60±2,68 ^a	46,70±2,6 ^a	44,29±2,68 ^a	44,84±2,6 ^a

^{a,b,c}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). AA: Ácido ascórbico; TRO: Trolox C; MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva.

5.2. Integridade da membrana plasmática e acrossomal, e da atividade mitocondrial

O percentual de integridade da membrana plasmática dos espermatozoides tratados com 0,25% de ácido ascórbico (AA0,25) (Figura 6) foi maior que os demais tratamentos (Tabela 2; P<0,05).

Figura 6. Espermatozoides de carneiros corados com PI e Hoechst 33342. Espermatozoides com membrana plasmática intacta (A) e lesada (B).

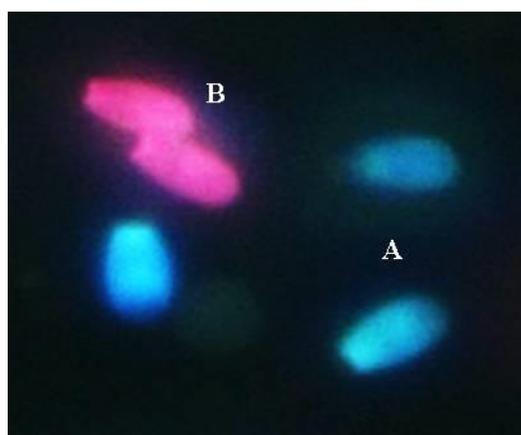


Tabela 2. Integridade da membrana plasmática e do acrossoma, e atividade mitocondrial de espermatozoides descongelados de carneiros tratados ou não com diferentes concentrações de antioxidantes antes da criopreservação (Média±DP)

(%)	Controle	Trolox C		Ácido Ascórbico	
		TRO100	TRO200	AA0,05	AA0,25
iMP	22,04±6,9 ^{bc}	18,80±6,9 ^c	23,67±6,9 ^{bc}	27,17±6,9 ^b	37,0±6,9 ^a
iAC	78,06±5,3 ^c	84,46±5,3 ^b	86,48±5,3 ^{ab}	89,0±5,3 ^{ab}	92,19±5,3 ^a
AM	87,54±3,5 ^d	91,85±3,5 ^c	93,46±3,5 ^{bc}	94,64±3,5 ^{ab}	97,04±3,5 ^a

^{a,b,c,d}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

AA: Ácido ascórbico; TRO: Trolox C; iMP: integridade da membrana plasmática; iAC: integridade do acrossoma; AM: atividade mitocondrial.

O tratamento com 0,25% de ácido ascórbico (AA0,25) ocasionou em maior percentual de espermatozoides com acrossoma intacto (Figura 7) e atividade mitocondrial (Figura 8) comparado aos tratados com TRO100 e controle (Tabela 2; P<0,05).

Figura 7. Espermatozoides de carneiros corados com FITC-PNA. Células espermáticas com membrana acrossomal intacta (A) e reagida/lesada (B).

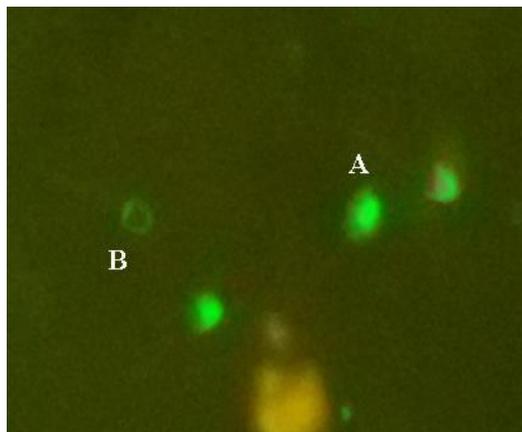
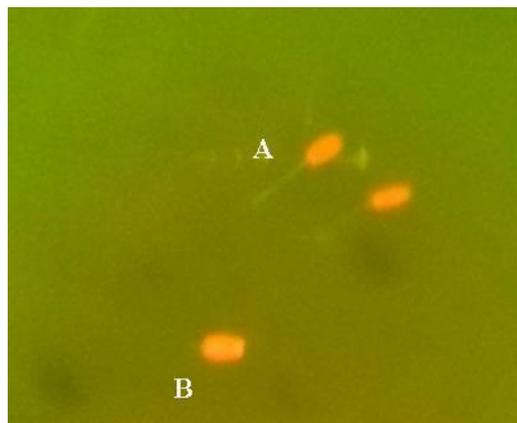


Figura 8. Cauda de espermatozoides de carneiros corados com R123. Células espermáticas com atividade mitocondrial (A) e sem atividade (B).



5.3. Capacidade de ligação espermática a MPV

Após o descongelamento, os espermatozoides tratados com 0,25% de ácido ascórbico (AA0,25) tiveram maior capacidade de ligação a membrana perivitelina (Figura 9) comparado aos demais tratamentos (Tabela 3; $P < 0,05$).

Figura 9. Espermatozoides corados com Hoechst 33342 ligados a MPV da gema do ovo.

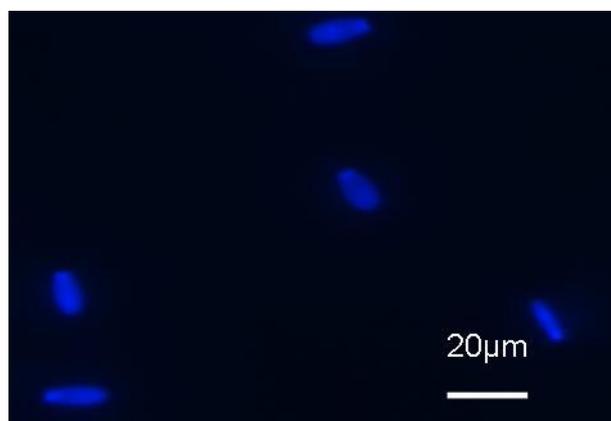


Tabela 3. Número (absoluto e relativo) de espermatozoides após descongelamento de carneiros, tratados ou não com diferentes concentrações de antioxidantes antes da criopreservação, ligados a MPV (Média±DP)

	NAE	NRE
Controle	115,70 ^b	1,0 ^b
TRO100	125,93 ^b	1,08 ^b
TRO200	141,83 ^b	1,22 ^b
AA0,05	144,86 ^b	1,25 ^b
AA0,25	155,73 ^a	1,34 ^a

^{a,b}Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

AA: Ácido ascórbico; TRO: Trolox C; NAE: Número absoluto de espermatozoides ligados a MPV; NRE: Número relativo de espermatozoides ligados a MPV.

6. DISCUSSÃO

A queda na motilidade é uma característica comum do espermatozoide criopreservado, devido ao estresse causado pelo processo de congelamento-descongelamento (WATSON, 2000). Neste contexto, há necessidade de selecionar ejaculados de excelente qualidade, no intuito de reduzir as perdas da qualidade espermática após a criopreservação, e assim, manter os níveis de fertilidade para um bom programa de inseminação artificial.

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é de suma importância, uma vez que, a motilidade espermática representa uma característica primordial para que o espermatozoide seja capaz de fecundar o oócito. Além disso, a análise computadorizada de sêmen oferece maior confiabilidade nos parâmetros avaliados, os quais têm sido correlacionados com provas de capacidade fecundante em testes *in vitro* (JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2001).

A motilidade total dos espermatozoides descongelados tratados com AA0,25 foi maior que o valor padronizado para ovinos pelo Manual para Exame Andrológico do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), e superior aos reportados em diversos estudos com sêmen ovino descongelado (MOSES et al., 1995; OLIVEIRA; NEVES; LUZ, 1988; EL-ALAMY; FOOTE, 2001; BAG et al., 2002). O ácido ascórbico melhora a cinética espermática, pois eleva as atividades antioxidativas das enzimas superóxido dismutase e catalase, que equilibram a ação negativa das ERO (GARCEZ et al., 2010). Maia et al. (2009) e Silva (2010) ao avaliarem a adição de 50 µL de Trolox C e 0,5% ácido ascórbico, respectivamente, no sêmen criopreservado de ovinos, observaram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo.

A motilidade progressiva em todos os espermatozoides tratados com Trolox C e ácido ascórbico encontrado em nossos estudos foram maiores que os reportados por Maia et al. (2009), que testaram a associação de Trolox C e catalase ($27,0 \pm 1,1$) no sêmen de carneiro. Corroboram com nossos resultados Peixoto et al. (2008) e Martinez-Páramo et al. (2012) ao descongelarem sêmen de carneiro e de peixe, respectivamente, tratados com vitamina C e Trolox C, encontraram redução dos efeitos negativos das ERO e melhora da motilidade espermática.

A utilização das concentrações de ácido ascórbico e Trolox C merece destaque na avaliação de motilidade progressiva de sêmen de ovinos, considerando que as concentrações dos antioxidantes utilizados foram eficientes na redução das espécies reativas de oxigênio após um ciclo de congelamento e descongelamento. Além disso, estes resultados foram superiores aos apresentados por Câmara et al. (2011) ao utilizarem glutathione redutase, superóxido dismutase e catalase como antioxidantes exógenos em sêmen de carneiro criopreservado, obtendo uma motilidade progressiva em torno de 30%.

Estes resultados quanto a motilidade progressiva são importantes, uma vez que, a motilidade é um dos fatores responsáveis para que o espermatozoide tenha condição de percorrer o trato reprodutivo feminino, e realizar a penetração efetiva nas células do *cumulus* e zona pelúcida do oócito.

A adição de 0,25% de ácido ascórbico proporcionou efeito benéfico na integridade de membrana plasmática avaliada pela associação das sondas PI e Hoechst 33342, dados que corrobora com os achados de Salamon e Maxwell (1995) que demonstraram espermatozoide com cerca de 30% intactos. Resultados semelhantes foram obtidos por Moraes; Costa e Souza (2015) ao testarem a associação de Trolox+ácido ascórbico, e Trolox+ácido ascórbico+melatonina em sêmen de carneiros, observaram de 23% a 28% de espermatozoides com membrana plasmática íntegra. Valcárcel et al. (1997) obtiveram resultados semelhantes ao avaliarem a integridade de membrana plasmática de sêmen de carneiros, cerca de 36,7% e 44%, mantiveram-se íntegros.

Desta forma, podemos presumir que o uso de 200 µL de Trolox C, 0,05 % e 0,25% de ácido ascórbico encontrados nesse estudo aumentou a capacidade de produção dos antioxidantes enzimáticos GSH, CSH-Px e catalase, reduzindo o potencial de lipoperoxidação lipídica, durante o processo de congelamento e descongelamento (HU et al., 2011).

Maia et al. (2009) e Silva et al. (2011) ao utilizarem a sonda fluorescente PI na avaliação de membrana plasmática de espermatozoides de ovinos, observaram que, independente do acromossoma encontrar-se lesado ou reagido, cerca de 31 e 38%, respectivamente, mantiveram a membrana plasmática intacta. Vimos que nossos percentuais de integridade acrossomal

nos tratamentos com antioxidante teve efeito benéfico ($P > 0,05$) quando comparados ao controle. Arruda et al. (2007), Maia (2006), Azevedo (2006) e Bittencourt et al. (2014) encontraram resultados inferiores ao nosso quanto a integridade acrossomal, 47,5%, 59,9%, 51,5% e 67,0%, respectivamente.

Todavia, Peixoto et al. (2008), avaliando a adição de ácido ascórbico e Trolox C na criopreservação de sêmen ovino, relataram que a adição desses antioxidantes não minimiza os efeitos negativos sobre a membrana acrossomal após a criopreservação. No entanto, Maia (2006) observou também que a utilização de Trolox C propicia um leve aumento nas concentrações de antioxidantes enzimáticos como a SOD, GPx e Catalase, o que não inibiu completamente a ocorrência da liporoxidação. De maneira similar, Silva et al. (2011a) relataram que a adição de superóxido dismutase (100 U/mL) e glutatona (2 e 5 mM) ao diluente de congelação do sêmen ovino, preserva a integridade do acrossoma espermático.

Sabe-se que a integridade de membrana plasmática e acrossomal são parâmetros que possuem maior correlação com a taxa de fecundação *in vitro* do que com a motilidade e morfologia, fato esse também observado por Januskauskas, Johannisson; Rodriguez-Martinez. (2001).

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial tem sido usada como forma de medir a função mitocondrial, por causa de sua relação com a síntese de ATP que é necessária para a motilidade do espermatozoide. Assim, vimos que a adição de Trolox C e ácido ascórbico no sêmen de carneiro melhoraram a função mitocondrial, pois o número de espermatozoides descongelados com potencial de atividade mitocondrial foi maior em todos os tratamentos com antioxidante.

Windsor e White (1995), utilizando a sonda R123, demonstraram que o processo de congelamento e descongelamento provoca severos danos à membrana mitocondrial do espermatozoide ovino. Moraes, Costa e Souza. (2015) reportaram o potencial de atividade mitocondrial com a sonda R123 em sêmen de ovino tratado com melatonina+ácido ascórbico+Trolox C de 96,43%. Beconi et al. (1993), obtiveram percentual maior de espermatozoides com mitocôndrias intactas ao adicionarem vitamina C (5 mM) e vitamina E (1 mg/mL) ao sêmen bovino, visualizando e redução dos efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio.

Embora os índices de atividade mitocondrial tenham sido considerado alto neste estudo, a integridade de membrana plasmática não acompanhou a acrossomal. Este fato pode estar relacionado com o tempo de incubação, supondo que muitas vezes as células espermáticas estão em um período de transição, ou seja, embora tenham perdido a integridade da membrana plasmática, ainda apresentam função mitocondrial, a qual perde sua capacidade apenas após um determinado período (VALCÁRCEI et al.,1997).

Segundo Baumber et al. (2000), a estrutura mitocondrial do espermatozoide é a menos afetada por concentrações fisiológicas de algumas espécies reativas de oxigênio. Entretanto, é sabido que as mitocôndrias são responsáveis pela energia que gera motilidade a célula espermática, demonstrando uma forte correlação entre os espermatozoides que possuam alto potencial de membrana mitocondrial, com aqueles que possuem capacidade de fecundação.

Vale salientar, que os resultados deste estudo são oriundos de carneiros com ejaculados de alta qualidade e baixo índice de patologias espermáticas. Segundo Alvarez e Moraes (2006) e Barbosa (2009), a grande produção de ERO ocorre de maneira exacerbada na presença de elevada quantidade de espermatozoides com gota protoplasmática e/ou com altas concentrações de leucócitos no ejaculado.

Sendo assim, a preservação da membrana plasmática e acrossomal e o a atividade mitocondrial observadas neste estudo, constata que a utilização de antioxidantes no meio diluidor é fundamental na proteção de alguns compartimentos celulares, reforçando ainda, a ideia de intensificar mais estudos visando a melhor constituição de diluidores, que, aliada às melhores curvas de resfriamento e congelamento, possam alcançar o pico máximo de proteção as diferentes estruturas da célula espermática.

A capacidade dos espermatozoides em se ligar à membrana de oócitos foi conduzida utilizando a membrana perivitelina da gema de ovo de galinha. Este tipo de teste tem sido utilizado para avaliar o sêmen de humanos, touros, suínos, garanhões e outras espécies, uma vez que, existem semelhanças moleculares entre a zona pelúcida e a membrana perivitelina de ovo de galinha, como reportado por Moraes et al. (2010).

A suplementação com 0,25% de ácido ascórbico teve a maior taxa de ligação dos espermatozoides à membrana da gema do ovo. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa et al. (2015), que testou melatonina+Trolox C+ácido ascórbico (1,54) e Trolox C+ácido ascórbico (1,54) nos espermatozoides descongelado de ovinos.

III. CONCLUSÕES

A adição de 0,25% de ácido ascórbico no sêmen fresco de carneiros antes da criopreservação melhora as características e a sobrevivência espermática após descongelamento, bem como seu potencial de fertilizante.

IV. REFERÊNCIAS

- ABOAGLA, E. M.-E.; TERADA, T. Effect of the supplementation of trehalose extender contain egg yolk with sodium dodecyl sulfate on freezability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.809-818, 2004.
- AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and postthawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. **Theriogenology**, v.57, p.1801-1808, 2002.
- AITKEN, R. J.; PATERSON, M., FISHER, H. et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v. 180, p. 2017-1025, 1995.
- ALBERTINI, R; ABUJA, P.M. Prooxidant and antioxidant proprieties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. **Free Radical Research**, v.30, n.3, p. 181-188, 1999.
- ÁLVAREZ, A. L.; SERRES, C.; TORRES, P. et al. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1-4, p. 89-91, 2006.
- ALVAREZ, C. A. MORAES, G. V. Efeitos da Selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2006.
- AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7:3, p. 145-173, 1987.
- ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W.J.; SIKKA, S.C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p. 869-880, 1999.
- ARRUDA, R. P. ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. E. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.
- ARRUDA, R. P. BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, L. K. M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 226-227, 2003a.
- ARRUDA, R. P. CELEGHINI, E. C. C.; SOUZA, L. W. O.; REBELATTO, F. L. Novas técnicas para a avaliação do sêmen de garanhões. *In: Simpósio Merial de equinicultura*, 1.; Porto Alegre, RS. P. 18-28, 2003b.
- ATESSAHIN, A.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; KIZIL, M. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat

semen following the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**. v. 77, p. 38–44, 2008.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stores stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.

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

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

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

BALL, B. B., VO, A. T. Detection of lipid peroxidaion in equine spermatozoa based upon the lipophilie fluorescent dye. **Journal Andrology**, v. 23, p. 259-269, 2002.

BARBOSA, F. F.S. **Influência dos antioxidantes na qualidade do sêmen de homens em tratamento de fertilidade**. 2000. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BAUMBER, J., SABEUR, K., VO, A., BALL, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**. v. 60, p. 1239–1247, 2003.

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

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

BAUMER, J. BALL., B. A.; LINFOR, J. J. et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal Andrology**. v. 24, p. 621-628, 2003.

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

BICUDO, S.D., AZEVEDO, H.C., MAIA, S.M., GREEN, R.E., RODELLO L. & MEIRA, C. Improvement on ram semen cryopreservation applied to artificial insemination programs and embryo technology. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p.787-798, 2007.

BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B. Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolos de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas Suffolk. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 473-474, 2003.

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

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

BITTENCOURT, R. F.; OBA, E.; RIBEIRO FIHO, A. L.; CHALHOUB, M.; VASCONCELHOS, M. F.; BISCARDE, C. A.; BICUDO, S. D. Trehalose and calcium chelator for ram semen cryopreservation. **Archives of Veterinary Science**, v. 19, p. 69-77, 2014.

BORGES, C. J. **Efeito da utilização de antioxidante diluidor para criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro***. JABOTICABAL, 2008. 94p. Tese (Doutorado Agrárias e Veterinárias), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal.

BRANCO, S. C.; GARCEZ, E. M.; PASQUALOTTO, F. F.; ERDTMAN, B.; SALVADOR, M. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. **Cryobiology**, v. 60, p. 235-237, 2009.

BRENER, E., RUBINSTEIN, S., COHEN, G., SHTERNALL, K., RIVLIN, J., BREITBART, H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology Reproduction**, v.68, p.837- 45, 2003.

BUCAK, M. N., TEKIN, N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. **Small Ruminant Research**, v. 73, p. 103–108, 2007.

BUCAK, M. N.; AHIN, A. A.; YUCE, A.; Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**. v. 75, p. 128-134, 2008.

BUCAK, M.N., ATESSAHIN, A., VARIS L. O., YUCE, A., TEKIN, N. A. K. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology**, v.67, p.1060– 1067, 2007.

CÂMARA, D. R.; SILVA, S. V.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F. GUERRA, M. M. P. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v.76, p. 342–350, 2011.

CASTILHO, F. E.; GUIMARÃES, D. J.; MARTINS, F. L.; PINHO, O. R.; GUIMARANHÃES, F. E. S.; ESPESCHIT, B. J. C. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2335-2345, 2009.

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

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. Belo Horizonte: 1998, 49p.

COLETO, Z. F. **Congelação do sêmen da espécie canina adicionado de antioxidantes**. Recife, 2006. 111p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária), Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

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

COSTA, J. M. S.; SOUZA, W. L.; MORAES, E. A.; GRAHAM, J. K. Adding antioxidants to ram sperm improves sperm binding capability after cryopreservation. **Joint Annual Meeting**. In ADSA-ASAS. Orlando, Florida, 2015.

COULTATE, T. P. Alimentos: A química e seus componentes. 3ª Ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 368, 2004.

COYAN, K.; PINAR, N. B.; BUCAK, M. N.; AKALIN, P. P.; ATAMAN, M. B., et al. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 426–431, 2010.

CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 46-52, 2000.

CURRY, M.R., WATSON, P.F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. **Cryobiology**, v.31, p.39-46, 1994.

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.; LAMONTHE, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. **Free Radical Biology e Medicine**, v.46, p.502-510, 2009.

DUCHEN, M. R.; CROMPTON, M.; PEUCHEN, S.; NOWICKY, A. The use of a carbocyanine dye, JC-1, to monitor changes of mitochondrial potential in isolated mammalian cells. **Journal of Physiology**, v. 473, p.7, 1993.

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

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**, cap.2, p.29-77, 1994.

EL-ALAMY, M.A.; FOOTE, R.H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 10, 2001.

FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Assessment of *Psium sativum* agglutinin in identifying acrossosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, p. 23-27, 1992.

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.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysic**, v. 1469, p.197-235, 2000.

FOOTE, R. H; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.13-23, 2002.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, n.4, p.286-289, 2008.

GARCEZ, M. E.; BRANCO, C. S.; LARA, L. V.; PASQUALOTTO, F. F.; SALVADOR, M. Effects of resveratrol in supplementation on cryopreservation medium of human semen. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 6, p. 2118-2121, 2010.

GAVELLA, M.; LIPOVAC, V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isoenzyme pattern of sperm in infertile men. **Arch Androl**, v.28, p.35-41, 1992.

GIL-GUZMAN, E.; OLLERO, M.; LOPEZ, M. C., et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction**, v. 16, p. 1922-1930, 2001.

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

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando diversas técnicas de congelamento e crioprotetores sobre os parâmetros espermáticos e a interidade de membranas do espermatozóide bovino**. 2004, 92p Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 16, n. 9, p. 1922-1930, 2001.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen, **Theriogenology**. v. 64, p. 492–504, 2005.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.** 12 (1), 119-129, 1996.

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

GUERRA, M. M. P. Importância dos oxidantes na fisiologia espermática. In: **Congresso Norte/nordeste de Reprodução Animal**, 2. 2005. Proceedings..., Teresina, 2005. CD-ROOM.

GUERRA, M.M.P., EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. The role of oxidants and antioxidants on andrology. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 28, p. 187–195, 2004.

GUERRA, P. M. M. P.; CÂMARA, R. D.; SILVA, B. C. E.; SILVA, V. S. Uso de antioxidantes em ovinos. **Ciência Animal**, v. 22, p. 354-364, 2012.

HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7^a ed., Barueri: Manole, 513p. 2004.

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

HAUGLAND, R. P. **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. Molecular probes, 2001.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**. V. 53; p. 47–58, 2000.

HU, J. H.; ZHAO, X. K.; TIAN, W. Q.; ZAND, L. S.; LI, Q. W. Effects of vitamin E supplementation in the extender on frozen-thawed bovine semen preservation. **The Animal Consortium**, v. 5, p. 107-112, 2011.

ISACKENKO, E.; ISACKENKO, V.; KATKOV, I.I., et al. DNA integrity motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. **Human. Reproduction**. v. 19, n.4, p. 932-939, 2004.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenology**, v. 55, p. 947-961, 2001.

JOU, M.-J.; PENG, T.-I.; YU, P.-Z.; JOU, S.-B.; REITER, R. J.; CHEN, J.-Y.; WU, H.-Y.; CHEN, C.-C.; HSU, L.-F. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 4, p. 389-403, 2007.

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.

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

KUMAR, M.; BEHERA, A. K.; KUMAR, S.; SNINIVAS, V. R.; DAS, H. R.; SUROLIA, A.; DAS, R. H. Expression, purification and characterization of peanut (*Arachis hypogea*) agglutinin (PNA) from baculovirus infected insect cells. **Bioscience Reports**, v. 19, n.3, p. 227-234, 1999.

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

- MACLEOD, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. **American Journal and Physiology**, v.138, p.512-518, 1943.
- MAHFOUZ, R.; SHARMA, R.; THIYAGARAJAN, A.; KALE, V.; GUPTA, S.; SABANEKH, E.; AGARWAL, A. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in fertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. **Fertility. Steril.** 2010.
- MAIA MS, BICUDO SD, SICHERLE CC, RODELLO L, GALLEGOS ICS. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extender with antioxidants. **Small Ruminant Research.** v. 23, p.122;118, 2010.
- MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase.** 2006. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.
- MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** v.33, n.4, p.183-193,2009.
- MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SICHERLE, C. C.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research.** v. 85, p. 85–90, 2009.
- MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, p. 80-89, 2006.
- MARCHESI, D. E.; FENG, H. L. Sperm DNA integrity from sperm to egg. **Journal of Andrology**, v. 28, p. 481-489, 2007.
- MARQUES, A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. et al. Effects of ascorbic acid and pentoxifyline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.
- MARTI, E.; MARTI, J.I.; MUINÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 29, p. 459-467, 2008.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M. T.; HERRAÉZ, M. P.; SARASQUESTE, C.; CABRITA, E. Incorporation of ascorbic acid and alfa tocoferol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, v. 77, p. 1129-1136, 2012.

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

MEYERS, S. A.; TABLIN, F.; COWE, J. H. Does cellular injury resulting from cryopreservation share traits with sperm capacitation? **In: proceedings of a work shop on transporting gametes and embryos**. Brewster – Massachusetts, v. 12, p.70-73, 2003.

MOORE, A.I. et al. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.26, n.5, p.215-218, 2006.

MORAES, E. A.; COSTA, J. M. S.; SOUZA, W. L. Antioxidants improve membrane integrity and acrossome and sperm mitochondrial activity in ram sperm after cryopreservation. **Joint Annual Meeting**. In ADSA-ASAS. Orlando, Florida, 2015.

MORAES, E. A.; GRAHAM, J. K.; TORRES, C. A. A.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.148–154, 2010.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC), 2000. Minerals. In: Nutrient Requirements of Beef Cattle. Natl. Acad. Press, Washington, DC, pp. 54–74.

NISHIKIMI, M.; MACHLIN, L.J. Oxidation of α -tocopherol model compound by superoxide anion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 170, p. 684-689, 1975.

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.

O'FLAHERTY, C. M.; BEORLEGUI, N. B.; BECONI, M. T. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrology**, v. 29, p. 269-275, 1997.

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

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

PEIXOTO, A. L. V. A.; MONTEIRO JR, P. L. J.; CAMARA, D. R.; VALENCA, M. M.; SILVA, K. M. G.; GUERRA, M. M. P. Efeito do tempo de incubação pós-

descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com tris-gema suplementado com vitamina c e Trolox C. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, p. 16-24, 2008.

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.

PEREZ, E. G. A.; NICHI, M.; BARNABE, V. H. Efeito da adição de Glutathione na função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, p. 262-268, 2012.

PERIS, S.I., BILODEAU, J.F., DUFOUR, M. Impact of Cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction Development**. v. 74, p. 878–892, 2007.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger. Cap. 83, p. 769-789, 1992.

PURDY, P. H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5 °C prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science** v. 93, p.114–23, 2006.

RAMALHO, V. C; JORGE, N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e alimentos Gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n.4, 2005.

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

RODELLO, L. Validation of cooling and freeze automatized system for ovine semen. Thesis (Master in Veterinary Medicine). **Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science**, UNESP, Botucatu, 2006.

ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M. et al. Heterologous in vitro fertilisation and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**., v. 58, p. 475-482, 1998.

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

SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.2. Cary, USA: **SAS Institute Inc**; 2002-2008.

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.

SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F.; OLIVEIRA, K. P. L.; VIEIRA, V. L.; GONDIM, J. M.; MATEOS-REX, E. Utilização de diluentes à base de água de coco “in natura” e em pó na inseminação artificial programada de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 5, p.96-98, 2002.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, 2004.

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

SCOTT, M. A. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproduction tract. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 337-348, 2000.

SICHERLE, C. C.; MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; RODELLO, L.; AZEVEDO, H. C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. **Small Ruminant Research**. v. 95, p. 144–149, 2011.

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. **Reproduction in Domestic Ruminants VI**, v. 64, p. 466, 2006.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproduction technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SILVA, B. C. L. **Efeito da adição de diferentes crioprotetores e antioxidantes na criopreservação do sêmen de ovinos da raça Santa Inês**. Recife, 2010. 98p. Tese (Mestrado em Ciência de Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife.

SILVA, K. M. G.; GAMBOA, S. C.; RODRIGUES, A. S.; SANTOS, J. R.; GUERRA, M. M. P. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelamento de sêmen de garanhões férteis e subférteis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2271-2277, 2008.

SILVA, P. F. N. GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

- SILVA, S.V.; BATISTA, A.M.; COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P. Diferentes métodos e técnicas na avaliação espermática: um breve revisão. **Ciência Veterinária Trópica**, v.12, p.1-15, 2009.
- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 874-981, 2011.
- SONMEZ, J. L.; DERMICI, M. J. The Effect of Ascorbic Acid on the Freezability of Ram Semen Diluted with Extenders Containing Different Proportions of Glycerol. **Turk Journal Veterinary Animal Science**, v. 28, p. 893-899, 2004.
- SOUZA, W. L.; COSTA, J. M. S.; MORAES, E. A.; TORRES, L. R. C.; COELHO, V. G.; MAGALHÃES, L. M. V. **Efeito da adição de diferentes concentrações de crioprotetores ao meio diluente de sêmen ovino após a criopreservação**. Simpósio de Produção Animal do Vale do São Francisco, Petrolina-PE, 2014.
- STEDMAN, T. L. **Stedman: dicionário médico**. 27 ed. Rio de Janeiro, p. 219, 2003.
- TILBUG, M. F. V.; SILVA, J. F. S.; DIAS, A. J. B.; QUIRINO, C. INFLUÊNCIA DA INSULINA NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE OVINO. **Ciência animal brasileira**, v.9, p. 731-730, 2008.
- VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A. PÉREZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Assesment of the acrossosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lecitin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p.299-309, 1997.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 481-492, 2000.
- WINDSOR, D.P.; WHITE, I.G. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. **Animal Reproduction Science**, v.40, p.43-58, 1995.
- WU, T-W.; HASHIMOTO, N.; WU, J.; CAREY, D.; LI, R-K., MICKLE, D.A.G.; WEISEL,R.D. The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. **Biochemical Cell Biology**, v.68, p. 1189-1194, 1990.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, Ltd., 1994. v.1, p.189-317.

ZEGINIADOU, T.; PAPADIMAS, J.; MANTALENAKIS, S. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. **Andrologia**, v. 32, n.9, p. 335-343, 2000.

V. ANEXOS

A) Tris-gema de ovo:

3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose; 2% de glicerol; 20% gema de ovo; 2% de glicerol; 100 mL de água destilada (sqs).

B) Solução de Trolox C (10mM)

0,0125 g de Trolox C em 5 mL de Tampão Tris

C) Iodeto de propídio (Sigma-Aldrich, 28, 707-5 – 25 mg)

Solução estoque: 25 mg de PI + 1 mL de DMSO

Solução trabalho: 20 μ L da solução estoque + 980 μ L de PBS

Armazenar em freezer, protegido completamente da luz.

D) Rodamina 123 (R123, Molecular Probes, R302 – 25 mg)

Solução estoque (DMSO) – 5 mg/mL

Solução trabalho (DMSO) – 0,2 mg/mL

Armazenar em freezer, protegido completamente da luz.