

ADRIANA TRINDADE SOARES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS
CRIOPRESERVADOS EM DILUENTE À BASE DE LEITE
DESNATADO ACRESCIDO DE GLUTATIONA REDUZIDA E
TROLOX EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

RECIFE

2010

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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS
CRIOPRESERVADOS EM DILUENTE À BASE DE LEITE
DESNATADO ACRESCIDO DE E GLUTATIONA REDUZIDA E
TROLOX EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra

RECIFE - PE

2010

Ficha catalográfica

S676a Soares, Adriana Trindade
Avaliação *in vitro* de espermatozóides caprinos
criopreservados em diluente à base de leite desnatado
acrescido de glutathione reduzida e trolox em diferentes
concentrações / Adriana Trindade Soares. -- 2010.
89 f.: il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2010.

Referências

1. Avaliação 2. Espermatozóides 3. Congelação
4. Antioxidantes I. Guerra, Maria Madalena Pessoa,
orientadora II. Título

CDD 636.39089

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

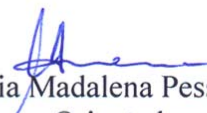
**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS
CRIOPRESERVADOS EM DILUENTE À BASE DE LEITE
DESNATADO ACRESCIDO DE GLUTATIONA REDUZIDA E
TROLOX EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

Tese de Doutorado elaborada e defendida por

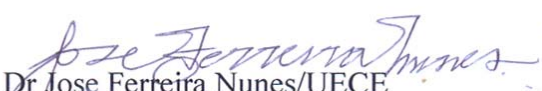
ADRIANA TRINDADE SOARES

Aprovada em 23 de Fevereiro de 2010

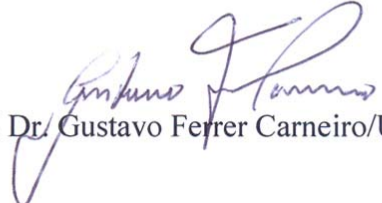
BANCA EXAMINADORA


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


Dr.^a Marciane da Silva Maia/ EMBRAPA-RN


Prof. Dr Jose Ferreira Nunes/UECE


Dr.^a Christina Alves Peixoto/Fiocruz-PE


Prof. Dr/ Gustavo Ferrer Carneiro/UFRPE

Aos meus pais, Espedito Alves Soares e Maria Auxiliadora Trindade

Soares, exemplos de amor, dedicação e perseverança.

O AMOR ANTIGO

*O amor antigo vive de si mesmo,
não de cultivo alheio ou de presença.
Nada exige nem pede. Nada espera,
mas do destino vão nega a sentença.*

*O amor antigo tem raízes fundas,
feitas de sofrimento e de beleza.
Por aquelas mergulha no infinito,
e por estas suplanta a natureza.*

*Se em toda parte o tempo desmorona
aquilo que foi grande e deslumbrante,
o antigo amor, porém, nunca fenece
e a cada dia surge mais amante.*

*Mais ardente, mais pobre de esperança.
Mais triste? Não. Ele venceu a dor,
e resplandece no seu canto obscuro,
tanto mais velho quanto mais amor.*

(Carlos Drummond de Andrade)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a **DEUS**, pelo infinito e incondicional amor;

A meus irmãos Pedro Jorge, Alana, Luciana, George, Jetro e Zé Neto, por facilitar minha interação com o doutorado, trabalho e família, e entender que, naqueles momentos, a prioridade seguia esta ordem;

Aos meus sobrinhos Rafael, Daiane e Davi, pela doçura de suas existências;

À Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra, por sua sabedoria, serenidade e discernimento. Dons que tão bem se afinaram com sua responsabilidade profissional e tornaram gratificante tê-la como *ORIENTADORA*;

À minha amiga Paula Fernanda Barbosa de Araújo Lemos, pessoa em quem me espelhava quando o desânimo batia, pois, serenamente e com sabedoria desempenhava perfeitamente o papel de Mãe, Esposa, Amiga e Profissional. Obrigada por sua amizade;

À minha amiga Sildivane Valcácia Silva, indiscutivelmente a pessoa que mais contribuiu na realização prática deste trabalho. Exemplo de amizade, desprendimento e amor ao próximo. Nesta vida *Amiga*, em outras, *Irmã*;

No início do curso, *Colegas*, hoje, com certeza, *amigos*: André Mariano Batista, Felipe Costa Almeida, Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Júnior e Diogo Ribeiro Câmara, Anne Kaline Andrade;

Ao amigo Felipe Queiroga Cartaxo, pela disponibilidade em analisar estatisticamente os dados deste trabalho;

Ao professor Dr. José Ferreira Nunes, por disponibilizar o Laboratório de Tecnologia do Sêmen da Universidade Estadual do Ceará (UECE) para a realização de uma das etapas deste trabalho;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Medicina Veterinária, pela oportunidade de ingressar no Curso de Doutorado da Instituição;

À Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA-PB), pela disponibilidade dos animais e laboratório indispensáveis neste trabalho;

Ao chefe da Estação Experimental Benjamim Maranhão/EMEPA-PB: Manoel Soares de Oliveira Filho, e ao pessoal de apoio: Antônio Jordão, Antônio Macedo, Francisco Antônio, Givaldo Sabino, João Manoel, José Ailton, José Gilvan, José Roque, José Soares, José Valter, Lenilton de Sousa, Marcelo Santos, Maria José, Robson José. Meu muito obrigada ao amigo Jefferson Viana, as amigas Semírames Nascimento e Fabiana Freitas, sempre disponíveis ao apoio logístico quando mais precisava, e como precisava...;

Às Dras. Janaina Viana de Melo e Karina Lidianne Alcântara Saraiva, pesquisadoras do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE-PE), pelo valioso préstimo na realização das análises ultraestruturais dos espermatozoides;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante a realização do Doutorado, e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ALH** = Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
- cAMP** = AMPcíclico
- BCF** = Frequência do Batimento de Flagelo
- CASA** = Sistema computadorizado de avaliação da motilidade espermática
- CAT** = Catalase
- DCF** = Diacetato de carboxifluoresceína
- DMSO** = Dimetilsulfóxido
- FITC-PNA** = Fluoresceína conjugado a Peanut aglutinin
- GSH-Px** = Glutathiona peroxidase
- GSH** = Glutathiona Reduzida
- iAC** = Integridade de acrossoma
- iMP** = Integridade de Membrana Plasmática
- IP** = Iodeto de Propídio
- JC-1** = Iodeto de 5,5',6,6' tetracloro-1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolil
- LIN** = Linearidade
- MET** = Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MP** = Motilidade Progressiva
- MT** = Motilidade Total
- PBS** = Tampão fosfato
- PMM** = Potencial da membrana mitocondrial
- ROS** = Espécies reativas ao oxigênio
- SOD** = Superóxido dismutase
- STR** = Retilinearidade
- VAP** = Velocidade de Trajeto
- VCL** = Velocidade Curvilínea
- VSL** = Velocidade Progressiva
- WOB** = Oscilação

LISTA DE TABELAS

	Página
Experimento 1	
Tabela 1- Porcentuais (média ± desvio padrão) de espermatozoides com membranas plasmática (iMP) e acrossomal (iAc) íntegros, e com alto potencial da membrana mitocondrial (aPMM) obtidos de reprodutores caprinos da raça Boer e criopreservados em diluente à base de leite desnatado e 7% de glicerol acrescido de Trolox.....	65
Tabela 2 - Parâmetros (média ± desvio padrão) da cinética das células espermáticas de reprodutores caprinos da raça Boer, criopreservadas em diluente à base de leite desnatado e 7% de glicerol acrescido de Trolox.....	66
Tabela 3 – Porcentual (média ± desvio padrão) de estruturas íntegras de espermatozoides caprinos, obtidos de amostras de sêmen <i>in natura</i> e criopreservadas em leite desnatado e glicerol 7%, suplementado com Trolox, avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão.....	67
Experimento 2	
Tabela 1- Porcentuais (média ± desvio padrão) de espermatozoides com membranas plasmática (iMP) e acrossoma (iAc) íntegros, e com alto potencial da membrana mitocondrial (aPMM) obtidos de reprodutores caprinos da raça Boer e criopreservados em diluente à base de leite desnatado e 7% de glicerol acrescido de Glutaciona reduzida (GSH).....	85
Tabela 2 - Parâmetros (média ± desvio padrão) da cinética das células espermáticas de reprodutores caprinos da raça Boer, criopreservadas em diluente a base de leite desnatado e glicerol acrescido de Glutaciona reduzida (GSH).....	86
Tabela 3 – Porcentual (média ± desvio padrão) de estruturas íntegras de espermatozoides caprinos, obtidos de amostras de sêmen <i>in natura</i> e criopreservadas em leite desnatado e glicerol, suplementado com Glutaciona reduzida (GSH), avaliadas por microscopia	

eletrônica de transmissão..... 87

LISTA DE FIGURAS

Página

Experimento 1

Figura 1 - Ultraestrutura de espermatozoides de reprodutores caprinos obtidos de sêmen *in natura* (A e B) e criopreservado (C, D, E e F) em diluente à base de leite desnatado e glicerol 7%. **A:** corte longitudinal da cabeça de espermatozoide apresentando membrana plasmática rompida (setas menores) e perda de material do acrossoma (seta maior); **B:** corte longitudinal da cauda de espermatozoide apresentando preservação do axonema (*) e mitocôndrias (setas); **C:** corte longitudinal da cabeça de espermatozoide criopreservado sem adição de antioxidantes (Controle) apresentando edema de membrana plasmática (setas); **D:** corte transversal da cauda de espermatozoide criopreservado com Trolox 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$ apresentando desorganização das mitocôndrias (seta); **E:** corte longitudinal da cabeça de espermatozoide criopreservado com Trolox 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$ apresentando integridade das membranas plasmática e acrossomal (seta); **F:** corte longitudinal da cabeça de espermatozoide criopreservado com Trolox 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$ apresentando edema de membrana plasmática (*)..... 68

Experimento 2

Figura 2 - Ultraestrutura de espermatozoides de reprodutores caprinos obtidos de sêmen *in natura* (A e B) e criopreservado (C, D, E e F) em diluente à base de leite desnatado e 7% de glicerol. **A:** corte longitudinal da cabeça de espermatozoide apresentando membranas plasmática e acrossomal íntegras (seta); **B:** corte longitudinal da cabeça de espermatozoide apresentando membrana plasmática rompida (seta); **C:** corte longitudinal da cabeça de espermatozoides criopreservado sem adição de antioxidantes (controle) apresentando rompimento (seta) e edema (*) da membrana plasmática; **D:** corte longitudinal da cabeça de espermatozóide criopreservado com diluente acrescido de GSH 2mM/mL apresentando ondulação da membrana plasmática (*); **E:** corte longitudinal da peça intermediária de espermatozoide criopreservado com diluente acrescido de GSH 5mM/mL apresentando rompimento da membrana plasmática (seta); **F:** corte transversal da peça intermediária de espermatozóide criopreservado com diluente acrescido de GSH

7mM/mL apresentando destruição das mitocôndrias (seta)..... 60

RESUMO

Objetivando-se avaliar *in vitro* o efeito da congelação de espermatozoides caprinos em diluente à base de leite desnatado acrescido de Trolox e Glutathiona reduzida (GSH) em diferentes concentrações, utilizou-se sêmen de cinco reprodutores, colhido com vagina artificial, em seis repetições. Após avaliação subjetiva (turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração espermática) de cada ejaculado, procedeu-se à formação do *pool* e diluição (240×10^6 espermatozoides/mL) com leite desnatado e glicerol 7%, acrescido de antioxidantes, de acordo com o experimento: Exp. 1) G1= Controle, G2= Trolox 30 μ M, G3= Trolox 60 μ M e G4= Trolox 120 μ M; Exp. 2) G1= Controle, G2= GSH 2mM, G3= GSH 5mM e G4= GSH 7mM. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em palhetas (0,25mL), congeladas e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C). Após descongelação (37°C/30 segundos), alíquotas de sêmen de cada grupo foram avaliadas quanto a integridade de membrana plasmática (iMP) e acrossoma (iAc), potencial de membrana mitocondrial (PMM), cinética espermática e ultraestrutura. As análises de iMP, iAc, PMM e cinética dos espermatozoides caprinos criopreservados em meio adicionado de diferentes concentrações de Trolox e GSH, não evidenciaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos. A ultraestrutura foi avaliada em amostras de sêmen *in natura* e pós-descongelação. Nos Exps. 1 e 2, as análises de iMP, iAc, PMM e cinética espermática dos espermatozoides caprinos criopreservados não evidenciaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos Controle e Trolox (30, 60 e 120 μ M/mL). No Exp. 1, a análise ultraestrutural evidenciou que os percentuais de acrossoma, membrana plasmática da região da cauda e axonema íntegros não diferiram ($P > 0,05$) entre grupos (Controle e Trolox 30, 60 e 120 μ M/mL), mas foram inferiores ($P < 0,05$) aos do sêmen *in natura*. Entretanto, as amostras dos grupos Trolox 60 μ M/mL e Trolox 120 μ M/mL apresentaram maior porcentagem ($P < 0,05$) de espermatozóides com membrana plasmática intacta na região da cabeça do que as dos grupos Controle e Trolox 30 μ M/mL, mas não diferiram ($P > 0,05$) do sêmen *in natura*. Maior porcentagem ($P < 0,05$) de espermatozoides com mitocôndrias intactas foi observada nas amostras de sêmen *in natura*, e dos grupos Controle e Trolox 60 μ M/mL do que naquelas do Trolox 30 μ M/mL e 120 μ M/mL. No Exp. 2, a análise ultraestrutural demonstrou que os percentuais de membrana plasmática (cabeça e cauda) e acrossoma íntegros não diferiram ($P > 0,05$) entre os grupos Controle e GSH (2, 5 e 7mM/mL), mas foram inferiores ($P < 0,05$) aos do sêmen *in natura*. Todavia, as amostras de sêmen *in natura* e do grupo Controle apresentaram maior percentual ($P < 0,05$) de gametas com axonema íntegros do que as dos grupos tratados com GSH (2, 5 e 7mM/mL). Maior porcentagem ($P < 0,05$) de espermatozóides com mitocôndrias íntegras foi observada nas amostras de sêmen do grupo Controle do que nos tratados com GSH (5 e 7mM/mL), e não diferirem das amostras do sêmen *in natura* e do GSH 2mM/ML. Com base na análise ultraestrutural, é possível concluir que Trolox 60 μ M/mL pode ser adicionado ao diluente de congelação de sêmen caprino, à base de leite desnatado e glicerol 7%, visando preservar a integridade da membrana plasmática na região da cabeça dos espermatozoides. Todavia, a adição de GSH (2, 5 e 7mM/mL) em diluente de congelação de sêmen caprino, à base de leite desnatado e glicerol 7%, não preserva a integridade dos espermatozoides.

Palavras-chave Criopreservação, sêmen, antioxidante, caprino.

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the effect of different concentrations of Trolox and Glutathione (GSH) it was used sperm from five bucks, collected by artificial vagina with six replicates. After subjective analysis (wave moving, motility, vigor and sperm concentration) of each ejaculate, a pool of samples was performed and diluted (240×10^6 sperm/mL) in skimmed-milk plus glycerol 7% with antioxidants, according to the experiment: Exp. 1) G1= Control, G2= Trolox 30 μ M, G3= Trolox 60 μ M and G4= Trolox 120 μ M; Exp. 2) G1= Control, G2= GSH 2mM, G3= GSH 5mM and G4= GSH 7mM. Samples were packed in straws (0.25 mL), frozen and stored in Liquid Nitrogen (-196 °C). After thawing (37 °C/30 seconds), semen aliquots of each group were submitted to iPM, iAc, MMP, kinematic by CASA and ultrastructure analysis. In the Exp. 1 and 2, it was observed that iPM, iAc, PMM and kinematics parameters showed no significant difference ($P>0.05$) among groups. Exp. 1, in ultrastructural analysis, acrosome, plasma membrane on the tail region and axoneme integrity did not differ ($P>0.05$) among groups, but they were observed in lower ($P<0.05$) percentage than those of fresh samples. However, Trolox 60 μ M/mL and Trolox 120 μ M/mL groups had higher ($P<0.05$) percentage of sperms with intact plasma membrane on the head region than control and Trolox 30 μ M/mL groups, but they did not differ ($P>0.05$) of the fresh samples. Higher percentage ($P<0.05$) of sperms with intact mitochondrias were observed on fresh, control and Trolox 60 μ M/mL samples than those of Trolox 30 μ M/mL and 120 μ M/mL. Exp. 2, in ultrastructural analysis, it was observed that percentages of acrosome and plasma membrane (tail and head region) intact did not differ ($P>0.05$) between Control and GSH (2, 5 and 7 mM/mL) groups, but they were lower ($P<0.05$) than in nature semen. However, semen samples of in nature and Control groups had higher percentage ($P<0.05$) of gametes with intact axonemes than those of GSH (2, 5 and 7 mM/mL) groups. Higher percentage ($P<0.05$) of sperms with intact mitochondrias were observed on Control group than those of GSH (5 and 7 mM/mL) groups, but it did not differed of in nature semen and GSH 2mM/mL. Based on ultrastructural analysis, it can be concluded that Trolox 60 μ M/mL can be used in skimmed-milk plus glycerol 7% diluent to preserve the integrity of sperm plasma membrane on the head region. However, the GSH (2, 5 and 7mM/mL) addition in skimmed-milk and glycerol 7% diluent to freezing goat semen did not preserve sperm integrity.

Keywords: Freezing, semen, antioxidants, goat.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	07
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	09
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Eventos Físicos da Criopreservação na Célula Espermática	17
2.2 Crioprotetores	19
2.3 Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS)	22
2.3.1 Ação das ROS na Capacitação Espermática.....	23
2.3.2 Ação das ROS na ligação do Espermatozoide à Zona Pelúcida....	24
2.4 Produção de ROS e Estresse Oxidativo no Sêmen	24
2.5 Antioxidantes	26
2.5.1 Vitamina E.....	27
2.5.2 Glutaciona.....	28
2.6 Adição de Antioxidantes em Preparações Espermáticas	29
2.7 Avaliação da Fertilidade do Sêmen	31
2.7.1 Análise da Integridade das Membranas Espermáticas com Sondas Fluorescentes	32
2.7.2 Análises da Cinética Espermática.....	34
2.7.3 Análise Ultraestrutural dos Espermatozoides.....	35
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	48
4.1 Avaliação <i>in vitro</i> de espermatozoides caprinos criopreservados em diluyente à base de leite desnatado acrescido de Trolox	49
4.2 Avaliação <i>in vitro</i> de espermatozoides caprinos criopreservados em diluyente à base de leite desnatado acrescido de Glutaciona reduzida	69
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial (IA) e transferência de embriões foram introduzidas na indústria caprina com os objetivos de acelerar o ganho genético (de animais superiores) e de superar alguns obstáculos da eficiência reprodutiva (LORENZO e CARNEIRO, 2003).

O uso da IA pode representar um poderoso instrumento para se atingir os objetivos da exploração racional de caprinos, destacando-se o melhoramento genético advindo da multiplicação de sêmen de bodes qualificados como superiores em testes de performance ou progênie; o controle de doenças sexualmente transmissíveis; a programação da exploração com o eventual controle do ciclo de produção e, ainda, o uso de sêmen congelado/descongelado para a preservação de germoplasma de raças ou espécies sob risco de extinção (SIMPLÍCIO, 1995). Apesar desse potencial, a IA em caprinos, principalmente na região Nordeste do Brasil, ainda é pouco aplicada e são inúmeras as razões atribuídas a este fato, entre elas, pode-se citar os resultados ainda pouco satisfatórios do uso do sêmen congelado/descongelado (GONZALEZ et al., 2002).

A redução da fertilidade, associada à IA com sêmen criopreservado vem sendo atribuída aos eventos ocorridos durante a congelação do sêmen, onde cerca de 10 a 50% dos espermatozoides de um ejaculado não resistem e morrem (WATSON, 2000).

O processo de congelação e descongelação causa alterações ultraestruturais, bioquímicas e funcionais que determinam redução da viabilidade da célula espermática. Durante a manipulação, os gametas são expostos ao oxigênio e várias etapas de seu processamento podem promover o aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (WATSON, 2000). As substâncias oxidativas, quando produzidas em excesso no organismo, em particular no líquido seminal, comprometem a motilidade do espermatozoide e sua capacidade fertilizante (GUERRA et al., 2004).

A capacidade de fertilização dos espermatozoides depende, entre outros fatores, de sua motilidade e integridade de membrana (ONOFRE et al., 2002). A forma como o estresse oxidativo afeta o processo de fertilização e causa danos ao embrião ainda é pouco conhecida. Sabe-se, no entanto, que uma variedade de mecanismos de defesa denominados de antioxidantes estão envolvidos nos sistemas biológicos e que o equilíbrio entre os benefícios e danos de ROS e antioxidantes, *in vivo* e *in vitro*, parece ser necessário para o funcionamento reprodutivo normal (GUERRA et al., 2004).

Desta forma, estudos envolvendo a adição de substâncias antioxidantes ao sêmen caprino submetido à criopreservação poderão contribuir para a otimização de técnicas reprodutivas. Por conseguinte, objetivou-se com este estudo avaliar *in vitro* o efeito da criopreservação de espermatozoides caprinos em diluente à base de leite desnatado e glicerol 7% acrescido dos antioxidantes Trolox e Glutathione reduzida em diferentes concentrações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Eventos Físicos da Criopreservação na Célula Espermática

Os procedimentos de congelação/descongelação do sêmen ocasionam danos celulares devido à mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozoide, lesões no DNA, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (BALL e VO, 2001). A célula espermática parece sensível ao estresse osmótico e à adição e remoção de crioprotetores (WATSON, 2000; BALL e VO, 2001).

Durante o processo de criopreservação o sêmen deve ser refrigerado da temperatura corpórea à temperatura ambiente (37 a 20 °C), sem ocasionar danos ao espermatozoide. Para isto é necessário diluir o sêmen em meio adequado. O estresse inicial se dá quando o espermatozoide é submetido à temperatura de refrigeração (5 °C), devido à transição de fase da membrana plasmática do estado líquido cristalino para o estado de gel (GRAHAM, 1996; MEDEIROS et al., 2002).

Quando efetuado de modo inadequado, o processo de refrigeração do sêmen causa choque térmico que induz a ocorrência de danos espermáticos irreversíveis, como padrão anormal de movimento (movimento circular ou retrógrado), perda rápida da motilidade, lesões no acrossoma e na membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares (GRAHAM, 1996).

O desafio celular durante a congelação e descongelação não é a capacidade da célula suportar temperatura muito baixa, mas de atravessar uma das fases críticas do processo, que é a redução da temperatura de -15 a -60 °C. As células normalmente resistem à redução da temperatura, entretanto não suportam a formação de cristais de gelo extracelular que determina a retirada de água do sistema, levando ao desequilíbrio osmótico com conseqüente desidratação celular (HOLT, 2000). A formação de cristais de gelo ocorre no espaço extracelular, criando um gradiente osmótico entre a solução intracelular inicialmente isotônica e a solução extracelular congelada que se encontra concentrada. Dependendo da velocidade de refrigeração, a água se move através da membrana plasmática e se une à fase congelada do meio extracelular ou irá congelar, formando gelo no interior da célula. Na maioria dos casos, as células submetidas à formação de cristais de gelo intracelular se tornam osmoticamente inativas ou lesionadas devido à perda da integridade da membrana (DENVIREDDY et al., 2002).

Durante o processo de criopreservação, a suspensão de espermatozoides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelação do meio (super resfriamento), antes que haja a formação de cristais de gelo. Quando estes cristais começam a se formar, ocorre aumento da temperatura, necessária à cristalização, o que pode ser deletério para o espermatozoide. O efeito da cristalização sobre os espermatozoides é minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelação. Quando o processo de congelação é muito lento ocorre a congelação da água extracelular com a consequente concentração de soluto, colocando a célula momentaneamente em um meio hipertônico e determinando perda rápida da água, ocasionando desidratação celular e aumento da concentração de soluto extracelular. Por outro lado, quando a célula é congelada rapidamente, não há perda de água, promovendo, com isso, a formação de cristais de gelo intracelular (MAZUR, 1985).

Sob a temperatura de 5 °C, a água intra e extracelular permanece super-refrigerada e não cristaliza. No entanto, entre as temperaturas de -5 e -10 °C tem início à formação de cristais de gelo no meio extracelular, o qual permanece super-refrigerado, ocorrendo troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular, ocasionando a desidratação celular. Neste momento, a curva de congelação deve ser lenta, para evitar a congelação da água intracelular, e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. A desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, determinando colapso da membrana. A perda de água e a desidratação celular são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de formar grandes canais de gelo dentro da célula, o que ocasionaria danos às estruturas internas e/ou à membrana plasmática (MEDEIROS et al., 2002).

O processo de descongelação depende de como o sêmen foi congelado. Espermatozoides congelados em curvas moderadas de temperatura necessitam de curvas moderadas de descongelação. Neste caso, como o gelo extracelular descongela lentamente, diluirá lentamente o soluto das frações de água não congeladas, permitindo que a água se difunda lentamente para dentro da célula, diluindo o soluto intracelular até atingir a concentração inicial. Se o espermatozoide é descongelado rapidamente, o gelo derrete rapidamente, diluindo o soluto do meio e a água entrará muito rapidamente no espermatozoide, o qual se encontra altamente concentrado, danificando a célula (GRAHAM, 1996).

É essencial que uma amostra de sêmen seja diluída corretamente para que contenha quantidade suficiente de diluidor para acomodar as células espermáticas em uma palheta de inseminação, de forma que uma taxa de fertilidade elevada possa ser alcançada usando o menor número de inseminações e de espermatozoides por inseminação (EVANS e MAXWELL, 1987; RITAR et al., 1990).

Segundo Chemineau et al. (1991), o tamanho da palheta deve determinar a altura sobre o nitrogênio líquido. Foi sugerido que as palhetas de 0,5 mL devem ser refrigeradas a 4 cm do nível de nitrogênio líquido durante 5 minutos e, então, mergulhadas no mesmo; enquanto as palhetas de 0,25 mL devem ser colocadas a 16 cm acima do nível do nitrogênio líquido durante 2 minutos, baixar para 4 cm durante 3 minutos e, então, mergulhá-las no nitrogênio líquido para posterior armazenamento.

Congeladores programáveis são convenientes para a congelação de grandes quantidades de palhetas de sêmen, além de controlar a taxa de congelação. O benefício de muitos congeladores programáveis é que a curva de refrigeração pode ser programada, por exemplo, 4 a 5 °C por 4 min, de -5 a -110 °C por 25 min e de -110 a -140 °C por 35 min e, somente então, as palhetas de sêmen são mergulhadas em nitrogênio líquido (PURDY, 2006).

2.2 Crioprotetores

Os crioprotetores devem ser adicionados ao diluente para proteger o espermatozoide durante a congelação/descongelação. Estas substâncias são importantes para evitar a formação de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico através da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelação da água, assim como servir como tampão ajustando as alterações do pH (MEDEIROS et al., 2002). Os sistemas tampões são um dos constituintes dos diluidores, pois o metabolismo dos espermatozoides resulta em produção de catabólitos tóxicos, que contribuem para o aumento do ácido láctico no meio extracelular, tornando o meio ácido e reduzindo a longevidade e a fertilidade dos espermatozoides. O pH ótimo para os espermatozoides é próximo da neutralidade, portanto os diluidores devem possuir pH entre 6,9 e 7,1 (OLIVEIRA, 2003).

O mecanismo de ação dos crioprotetores não se encontra totalmente elucidado. Acredita-se que estes reduzam o ponto de congelação da solução, o qual é determinado como a temperatura onde ocorre a formação dos primeiros cristais de gelo. A estrutura molecular é um parâmetro importante para determinar a eficiência do crioprotetor, uma vez que possuem afinidade pela água devido à presença de grupamentos amina e hidroxila em sua composição, os quais favorecem a formação de pontes de hidrogênio com as moléculas de água (BAUDOT et al., 2002). Estas ligações alteram a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo, criando um ambiente menos prejudicial às células (DALIMATA e GRAHAM, 1997).

Os crioprotetores interferem nas mudanças físico-químicas que sofrem as células durante o processo de criopreservação. Embora a concentração do crioprotetor seja elevada no meio, sua difusão é 30 a 60 vezes menor do que a da água (GRAHAM, 1996). Por conseguinte, estas moléculas atravessam a membrana até atingir o equilíbrio, ocasionando o enrugamento da célula devido à rápida saída de água para diluir a elevada concentração externa e somente depois de um período é que o crioprotetor penetra na célula e equilibra as concentrações intra e extracelulares. Nessas condições, a água retorna ao interior da célula até atingir o equilíbrio, que resulta na retomada do seu tamanho normal (SEIDEL, 1996).

Embora imprescindíveis para a sobrevivência dos espermatozoides no processo de congelação, os crioprotetores possuem efeitos tóxicos para o espermatozoide, tornando algumas substâncias utilizadas na criopreservação de outros tipos celulares impróprias para a célula espermática (WATSON, 2000). Em concentrações elevadas, os crioprotetores podem reduzir a capacidade fertilizante deste gameta devido a lesão por danos osmóticos (GRAHAM, 1996).

Apesar de seu mecanismo de ação não se encontrar perfeitamente esclarecido, sabe-se que o glicerol penetra na membrana celular através de difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma, uma vez que, semelhante aos agentes não penetrantes, proporciona desidratação celular através do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico que induz a saída de água das células espermáticas. Além do seu efeito osmótico, o glicerol parece atuar diretamente na membrana plasmática, havendo evidências de que se liga à cabeça dos fosfolipídios, reduzindo a fluidez da membrana, assim como interagindo com ligações protéicas e glicoprotéicas da membrana (PARKS e GRAHAM, 1992). Em uma solução contendo glicerol, no momento em que ocorrer a congelação, restará mais água descongelada do que naquela que não contém glicerol,

resultando no aumento do volume dos canais de solvente não congelado e na menor concentração de sais nesses canais (BAUDOT et al., 2002).

Algumas substâncias, como lipídios, proteínas e macromoléculas, são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelamento, sem que para isso necessitem penetrar no seu interior. Estas substâncias podem ser encontradas na gema de ovo, no leite, em alguns açúcares e na albumina sérica bovina. A gema de ovo contém lecitina que parece proteger a membrana celular por restituir os fosfolipídios perdidos pelos espermatozoides durante o choque térmico (WATSON, 1995).

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando a membrana espermática (MOUSSA et al., 2002), atuando na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolipídios e, aparentemente, induzindo alteração transitória de sua composição, o que previne a ruptura da membrana plasmática (FARSTAD, 1996).

Os açúcares atuam através da pressão osmótica na desidratação celular, diminuindo a quantidade de água passível de ser congelada no interior da célula, de modo a reduzir a injúria causada pela cristalização (AISEN et al., 2002). Além de atuar como crioprotetor, o açúcar age como substrato energético para o espermatozoide durante o período de incubação, protegendo a membrana plasmática durante a congelamento/descongelamento através de interações diretas com a mesma, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolipídios (YILDIZ et al., 2000).

Por restaurarem o percentual de água ao redor das cabeças dos fosfolipídios, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema que pode ocorrer com a congelamento. Geralmente os dissacarídeos (sacarose e trealose) são mais efetivos em estabilizar a bicamada da membrana plasmática do que os monossacarídeos (De LEEUW et al., 1993), mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e manutenção de lipídios numa fase fluida na ausência de água (ANCHOROGUY et al., 1987; CROWE et al., 1987).

O leite também é utilizado para diluir e armazenar o sêmen *in natura* ou refrigerado. Assim, Kundu et al. (2001) obtiveram excelente resultado pós-descongelamento ao utilizarem diluente à base de leite, glicose e glicerol na criopreservação de sêmen equino. Alguns aminoácidos como glutamina, histidina e glicina tem sido utilizados na criopreservação de sêmen de ovinos, garanhões e humanos. Gonzalez et al. (1999) obtiveram sucesso ao utilizar os diluidores à base de

glicina-gema ou glicina-gema-leite na criopreservação de sêmen ovino, enquanto Dorado et al. (2007) observaram melhores resultados, *in vitro*, após criopreservarem sêmen caprino utilizando diluente à base de Tris, quando comparado ao leite, embora essa melhoria não tenha sido refletida nos resultados de fertilidade após inseminação intracervical (52,4 % vs 42,9 %), com doses inseminantes criopreservadas em meio contendo leite e Tris, respectivamente.

2.3 Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS)

Conhecidos como oxidantes, as ROS são radicais produzidos por sistemas biológicos aeróbicos. Paradoxalmente, as células vivas, sob condições aeróbicas, requerem oxigênio (O_2) para dar suporte à vida, todavia seus metabólitos podem modificar suas funções. A produção de ROS ocorre em sistemas aeróbicos a partir do oxigênio molecular gerando o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (JORDÃO JUNIOR et al., 1998).

O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é um radical livre formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente na membrana mitocondrial através da cadeia respiratória. É também produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Sua formação ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos e eosinófilos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Este 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).

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

O radical hidroxila (OH^{\cdot}) é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outra ROS. É formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton. O radical hidroxila também pode iniciar a

oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, conhecida como lipoperoxidação. Induzem dano ao DNA, rápida perda do potencial fertilizante dos espermatozoides e perda da adenosina trifosfato do axonema da cauda (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

2.3.1 Ação das ROS na Capacitação Espermática

Durante a passagem pela cauda do epidídimo, os espermatozoides são encontrados em estado imóvel, caracterizados por baixa concentração intracelular de cAMP e cálcio, bem como apresentam suprimida sua capacidade de produzir ROS (WHITE e AITKEN, 1989). Essa condição é revertida durante os estágios iniciais da capacitação, onde se constata aumento na concentração de cálcio intracelular e cAMP cíclico, tendo início a produção de ROS, e, em consequência, os espermatozoides desenvolvem a forma altamente vigorosa de motilidade conhecida como hiperativação. Além disso, a capacitação também está associada ao aumento da fosforilação da tirosina proteica, resultando em alterações nas células espermáticas induzidas por ROS (AITKEN et al., 1995). Embora isso possa ocorrer espontaneamente sob condições apropriadas *in vitro*, seu progresso *in vivo* pode ser regulado pelo sistema reprodutor feminino, uma vez que fluidos ou células desse sistema também podem induzir a produção de ROS pelos espermatozoides (HUNTER et al., 1998).

O fato de a concentração de oxigênio nesses fluidos permanecer baixa, exceto no momento da ovulação (MASS et al., 1976), indica a relevância fisiológica do oxigênio e seus metabólitos nas funções espermáticas (De LAMIRANDE et al., 1997). Por outro lado, vale salientar que pequenas quantidades de espermatozoides alcançam o istmo da tuba uterina, ambiente rico em enzimas antioxidantes e conhecido como o local de início da capacitação espermática *in vivo* (KANEKO et al., 2001).

Segundo Leclerc et al. (1998), o aumento da atividade de cálcio intracelular durante a capacitação provoca incremento na concentração de cAMP que estimula a produção de superóxido e, em contrapartida, induz a fosforilação da tirosina proteica. Aitken et al. (1995) demonstraram que espermatozoides humanos expostos a condições de oxidação com H_2O_2 expressaram um significativo aumento da fosforilação em tirosina, enquanto que espermatozoides não estimulados à oxidação com H_2O_2 apresentaram baixos níveis de exocitose e fusão espermatozoide-ovócito.

2.3.2 Ação das ROS na ligação do Espermatozoide à Zona Pelúcida

Condições oxidantes promovem ou são requeridas para a reação acrossomática e a ligação dos espermatozoides à zona pelúcida, onde se evidencia que a peroxidação lipídica, geralmente associada à redução da viabilidade e da função espermática, também promove a habilidade dessas células ligarem-se à zona pelúcida (GRIVEAU et al., 1995).

A ligação do espermatozoide à zona pelúcida e a fusão com a membrana plasmática do ovócito são caracterizadas pela fosforilação da tirosina da cauda do espermatozoide, relacionada à motilidade hiperativada. Fatores envolvidos nessa fosforilação são obtidos de substâncias encontradas no meio que contém os espermatozoides, como por exemplo, a glicose, através de seus produtos metabólicos (trifosfato de adenosina-ATP e nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato oxidase-NADPH), que parece suportar o início da fosforilação da tirosina na cauda espermática responsável pelo processo de fertilização (URNER e SAKKAS, 2003). No momento da fusão com a zona pelúcida, praticamente todos os espermatozoides mostram cauda com tirosinas fosforiladas que são, subseqüentemente, desfosforiladas. Todavia, na ausência de glicose, tanto a fusão espermatozoide-ovócito quanto a fosforilação da tirosina na peça intermediária são inibidas, indicando que, nessa situação, a fosforilação da tirosina em toda a cauda é obrigatória para a fusão (URNER et al., 2001).

Dessa forma, conclui-se que a glicose participa na regulação da fosforilação da proteína tirosina durante a capacitação espermática e interação de gametas *in vitro*. A ausência de glicose durante a interação de gametas previne a fertilização, indicando que a indução da fosforilação de tirosina ocorre em tempo preciso, uma vez que a ligação do espermatozoide ao ovócito é crítica para o sucesso da fertilização (URNER e SAKKAS, 2003).

2.4 Produção de ROS e Estresse Oxidativo no Sêmen

Na espécie humana, existem duas fontes principais de ROS no ejaculado, o espermatozoide e os leucócitos. Ambos possuem um mecanismo similar de produção de ROS (NADPH localizada na membrana celular). Os leucócitos produzem ROS durante a fagocitose com capacidade cem vezes maior do que as células espermáticas. Por isso,

eles representam uma poderosa e potencialmente perigosa fonte de ROS, podendo ter efeito prejudicial na função espermática (AITKEN e CLARKSON, 1987).

Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), a primeira indicação de que o estresse oxidativo pode afetar a viabilidade e a função do espermatozoide ocorreu em 1943, quando MacLeod observou que o espermatozoide humano rapidamente perdia sua motilidade quando incubado sob elevadas concentrações de O₂ e que a adição de catalase oferecia alguma proteção.

As ROS exercem um papel duplo na fertilidade do macho, sendo responsáveis por processos como hiperativação da motilidade, capacitação, reação acrossômica e fertilização. Por outro lado, elas também podem causar severos danos ao espermatozoide quando os seus mecanismos de defesa estão limitados. Desta forma, o espermatozoide está continuamente vulnerável, porque uma produção controlada de ROS é de vital importância para a sua função normal, enquanto que a sua superprodução ou o sistema de defesa antioxidante inadequado determinam estresse oxidativo, resultando em um impacto negativo na fertilidade (AITKEN, 1995).

Outra explicação para a susceptibilidade do espermatozoide aos danos oxidativos espermáticos é que durante os estágios finais da espermatogênese, esses gametas descartam grande parte do seu citoplasma, eliminando enzimas citoplasmáticas de defesa que protegem as células somáticas de danos peroxidativos (GRIVEAU e Le LANNOU, 1997). Além disso, a capacidade de reparar DNA também é perdida, tornando a célula espermática mais vulnerável do que qualquer outra célula (AGARWAL e SAID, 2003).

Por conseguinte, sob condições oxidativas extremas, todos os componentes celulares incluindo lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares são potenciais alvo de estresse oxidativo, cuja extensão dos danos depende não somente da natureza e quantidade de ROS, mas também do momento e da duração de exposição, associado a fatores extracelulares, como temperatura e ambiente que pode resultar em morte celular (SHARMA et al., 1999).

A peroxidação dos lipídios parece ser uma causa particularmente importante de disfunção espermática. Os lipídios da membrana espermática são ricos em ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), responsáveis pela fluidez da membrana plasmática, necessária para que ele participe dos eventos de fusão de membranas associados com a fertilização. No entanto, espermatozoides que sofreram peroxidação lipídica apresentam redução da fluidez e da capacidade de fertilização (AITKEN, 1995).

Distúrbios no balanço oxidante/antioxidante em favor do oxidante determinam danos celulares, os quais são denominados danos oxidativos ou estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode resultar em adaptação ou injúria celular, podendo ser causado por: 1) Redução na quantidade de antioxidantes nos sistemas de defesa celulares, como por exemplo mutações nas enzimas de defesa antioxidantes Cu-Zn Superóxido dismutase (CuZnSOD), ou Glutathione peroxidase; 2) Produção elevada de ROS/RNS (espécies reativas ao nitrogênio), decorrentes da exposição à concentrações elevadas de O₂, a presença de toxinas que são metabolizadas produzindo ROS/RNS, ou a excessiva ativação dos sistemas naturais de ROS/RNS, como a ativação de células fagocitárias em doenças inflamatórias crônicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

2.5 Antioxidantes

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de inibir a oxidação ou qualquer substância que, mesmo presente em concentração reduzida, comparada ao seu substrato oxidável, diminui ou inibe a oxidação daquele substrato. Do ponto de vista biológico, define-se antioxidante como aquele composto que protege os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998).

A célula possui sistema de defesa antioxidante enzimático (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reduzida e glutathione redutase) e não enzimático (vitamina C, vitamina E, albumina, taurina, hipotaurina, ácido úrico, ácido lipóico, coenzima Q) (LEWIS et al., 1997; NORBERG e ARNÉR, 2001).

Nos sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agentes óxidos redutores, como as ROS e o sistema de defesa antioxidante. Todavia, as enzimas antioxidantes intracelulares não conferem proteção total à membrana plasmática, forçando os espermatozoides a complementar essa limitada defesa intrínseca com a proteção conferida pelo plasma seminal, o qual também contém antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SALEH e AGARWAL, 2002).

Durante a ejaculação, a secreção das glândulas sexuais acessórias adiciona alguns antioxidantes ao sêmen, como SOD, CAT, GPx, vitaminas C e E (LEWIS et al. 1997; ZINI et al., 2000). Os antioxidantes presentes no plasma seminal normalmente ajudam a proteger os espermatozoides dos danos oxidativos, mas a retirada do plasma seminal e, conseqüentemente, parte dos antioxidantes pode ocasionar perda da

capacidade protetora, deixando os espermatozoides susceptíveis à maior produção de ROS (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Dessa forma, durante as manipulações espermáticas em laboratório, especialmente na ausência do plasma seminal, os antioxidantes celulares são importantes em preservar a motilidade e a habilidade dos espermatozoides de sofrerem capacitação e reação do acrossoma (GUERRA et al., 2004).

Segundo Aitken (1995), a capacidade biossintética do espermatozoide é limitada, tornando difícil para ele substituir qualquer molécula que tenha sido danificada. Além disso, as enzimas antioxidantes podem estar concentradas na peça intermediária, deixando grande parte da membrana que cobre a cabeça e a cauda espermática menos protegida.

2.5.1 Vitamina E

A vitamina E (α – Tocoferol) foi descoberta em 1923, por Evans e Bishop, em estudos de fertilidade em ratos. Devido ao seu papel na fertilidade, esta substância foi chamada de tocoferol por significar, literalmente, que é capaz de “*assegurar nascimentos normais*” (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998).

Os tocoferóis possuem quatro moléculas com capacidade antioxidante ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$). Dentre todos os tocoferóis conhecidos, o α -tocoferol tem sido considerado o mais ativo biologicamente, sendo o principal antioxidante lipossolúvel encontrado nas membranas celulares. O fato de ser lipossolúvel confere ao α -tocoferol propriedade de se acumular no interior das membranas celulares (MACHLIN e BENDICH, 1987). Acredita-se que a vitamina E (α -tocoferol e seus derivados) seja o inibidor primário de radicais livres encontrados em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos e no plasma seminal (SIKKA, 2004), protegendo as células do estresse oxidativo *in vivo* e *in vitro* (KAGAN et al., 1992).

O grupo hidroxila (-OH) presente na sua composição é o responsável por sua propriedade antioxidante, através do qual reage com elétrons desemparelhados. É essencial a captura de radicais peroxil e alcóxila, agindo na inibição da reação em cadeia da lipoperoxidação (LIEBLER, 1993). No entanto, dependendo dos compostos presentes na reação, a vitamina E pode exercer efeito anti ou pró-oxidativo (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999). Para Bolle et al. (2002), a vitamina E pode exercer um duplo papel, dependendo da concentração administrada *in vitro*.

O Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico), análogo sintético da vitamina E, é hidrossolúvel na sua fórmula, o que torna sua utilização conveniente para estudos em sistemas biológicos naturais, devido à sua solubilidade em água, com potente propriedade antioxidante (WU et al., 1991). Seu mecanismo antioxidante é semelhante ao da vitamina E, ou seja, envolve o OH fenólico e a remoção de radicais peroxil (ALBERTINI e ABUJA, 1999). O Trolox é distribuído em ambas as fases da bicamada de lipídios das biomembranas, tornando-se um excelente protetor contra a lipoperoxidação e, além disso, pode ser adicionado diretamente à membrana lipídica sem a necessidade de solventes ou outros métodos de extração (BARCLAY et al., 1995).

2.5.2 Glutathione

A Glutathione (L-Y-Glutamyl-L-Cysteinylglycine) é um tripeptídeo distribuído nas células com importante papel nos mecanismos de defesa intracelular contra o estresse oxidativo. O núcleo do resíduo cisteinilglycine da Glutathione está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz, por exemplo, de reagir com um elétron não pareado de um radical livre. Esta substância é hábil em inativar diretamente ROS como O_2^- e OH^- (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998), exercendo um importante papel na detoxificação e antioxidação dos compostos endógenos, bem como na manutenção do *status* redox intracelular (LUBERDA, 2005).

Por ser distribuída em todo organismo animal, a Glutathione exerce numerosas funções biológicas e está presente nas células germinativas onde participa dos eventos de maturação do oócito, fertilização e pré-implantação do embrião. A Glutathione está envolvida na proteção contra danos oxidativos nos gametas masculino e feminino (LUBERDA, 2005).

O grupo sulfidril (SH) da Glutathione confere a ação protetora contra os danos oxidativos. A GSH está presente nas células em concentrações de 0,5 - 10mM, principalmente na forma reduzida da Glutathione. No espermatozoide, a Glutathione é encontrada em maiores concentrações na peça intermediária (KNAPEN et al., 1999). No entanto, o processo de criopreservação estabelece significativa redução da Glutathione no sêmen de diversas espécies (GADEA et al., 2007).

2.6 Adição de Antioxidantes em Preparações Espermáticas

Com o objetivo de reduzir danos oxidativos causados pela concentração elevada de ROS e aumentar a viabilidade espermática, algumas pesquisas têm sido realizadas com a adição de substâncias antioxidantes (trolox, vitamina E, glutathiona, vitamina C, catalase, cisteína, superóxido dismutase, taurina) como componente do diluidor de sêmen caprino (SINHA et al., 1996; GARDÓN et al., 2003), ovino (UPRETI et al., 1997; SARLOS et al., 2002; GARDÓN et al., 2003; BUCAK e TEKIN, 2007; BUCAK et al., 2008; PEIXOTO et al., 2008; MAIA et al., 2009), bovino (BILODEAU et al., 2000 e 2002; BORGES, 2003 e 2008; GADEA et al., 2007; UYSAL et al., 2007), eqüino (SILVA et al., 2009), suíno (PENÃ et al., 2003; GADEA et al., 2004) e canino (MONTEIRO et al., 2009).

Sinha et al. (1996), utilizando Glutathiona reduzida (GSH; 2mM e 5mM) em amostras espermáticas de caprino diluídas e criopreservadas em meio a base de Tris, observaram aumento significativo da motilidade e da integridade de acrossoma nas amostras contendo GSH-5mM. Todavia, segundo estes autores, a taxa de concepção não revelou diferença significativa entre as duas concentrações, indicando aparente aumento com GSH-5mM, apesar de terem diferido do grupo controle (GSH 0mM), sugerindo que este antioxidante protege as membranas dos espermatozoides dos danos da peroxidação lipídica, mantendo a motilidade espermática e conseqüente aumento das taxas de concepção.

Gardón et al. (2003), objetivando investigar os efeitos da GSH (0, 1 e 5mM) adicionada ao meio de descongelamento, sobre a motilidade espermática e a produção de ROS nos espermatozoides criopreservados de caprinos e ovinos, constataram efeito significativamente positivo do antioxidante em ambas as espécies. Em ovinos, a concentração de 5mM foi efetiva, comparando todos os grupos. Em caprinos, não houve diferença entre as concentrações de glutathiona, o que provavelmente poderia estar relacionado com as variações nos padrões seminais dos animais, constatado pela interação do macho com tratamento. Entretanto, os autores observaram efeito positivo dos grupos tratados em relação ao grupo controle.

Peixoto et al. (2008), avaliando a motilidade progressiva, a integridade do acrossoma e o estresse oxidativo de espermatozoides ovinos criopreservados em meio adicionado de Trolox-60µM/L; vitamina C-600µM/L; Trolox-60µM/L + vitamina C-600µM/L, não evidenciaram efeito significativo dos antioxidantes sobre os parâmetros

utilizados, e constataram que as concentrações dos antioxidantes não foram suficientes para contrapor o efeito negativo do aumento da produção de ROS. Entretanto, os autores ressaltaram que a média de espermatozoides com estresse oxidativo observada nas amostras *in natura* (66,0%) indicava que estas células já apresentavam desequilíbrio entre as concentrações de ROS e de antioxidantes endógenos, o qual foi intensificado pelo processo de congelação/descongelação.

Maia et al. (2009), adicionando Trolox ($50\mu\text{M}/100\times 10^6/\text{sptzs}$), catalase ($50\mu\text{g}/\text{mL}$) ou associação dos dois antioxidantes ao diluidor Tris-gema na criopreservação de sêmen ovino, constataram que a catalase apresentou melhor resultado na viabilidade do espermatozoide após a congelação/descongelação. No entanto, recomendaram que a concentração ideal de Trolox ainda deve ser determinada, uma vez que, nas concentrações utilizadas, seu efeito antioxidante não foi tão evidente quanto ao da catalase. Estes autores enfatizam ainda que a associação de catalase e Trolox ao diluidor teve efeito deletério sobre a motilidade e a viabilidade espermática, o que não aconteceu, quando utilizados isoladamente.

Sarlos et al. (2002) estudaram o efeito dos antioxidantes acetato de α -tocoferol, glutathione peroxidase, aromex (antioxidante sintético), resveratrol (3,4',5-trihidroxi-estilbeno), resveratrol + vitamina E e resveratrol + aromex, na motilidade e na integridade das membranas espermáticas do sêmen de carneiro. Esses autores observaram que a adição de antioxidantes prolongou o período de conservação do sêmen, melhorou a motilidade do espermatozoide e reduziu a ocorrência de danos celulares.

Foote et al. (2002) avaliaram o efeito da adição de Glutathione, superóxido dismutase, ácido ascórbico, hipo-aurina, tempo e tempol ao diluente à base de leite integral e glicerol, sobre a motilidade e a fertilidade do espermatozoide bovino. Esses antioxidantes não exerceram nenhum efeito benéfico na motilidade ou na fertilidade, o que foi atribuído à presença da caseína, antioxidante natural encontrado no leite.

Na espécie bovina, Borges (2003), utilizando vitamina E no meio diluidor para criopreservação de sêmen bovino, constatou proteção sobre as membranas plasmática e acrossomal, o mesmo não ocorrendo com a motilidade progressiva. Posteriormente, Borges (2008), realizando testes *in vitro* (integridade da membrana plasmática utilizando iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína) e *in vivo* (inseminação artificial), com sêmen criopreservado em meio adicionado de Trolox ($200\mu\text{M}$), provenientes de touros com grande porcentagem de patologias espermáticas e touros

normais, não constataram efeito significativo dos tratamentos sobre a integridade da membrana plasmática. No entanto, observou que os animais com maior porcentagem de patologia espermática responderam positivamente ao tratamento com o antioxidante, verificando aumento na taxa de prenhez ($P < 0,05$), quando comparado ao grupo controle (sem antioxidante).

Uysal et al. (2007), estudando os efeitos de vários antioxidantes (Glutathione reduzida 5mM, Glutathione oxidada 5mM, cisteína 5mM, taurina 50mM, trealose 50mM, hipo-aurina 25mM, hialuronidase 1000 μ g/mL, albumina sérica bovina 5mg/mL) sobre a viabilidade de espermatozoides bovinos criopreservados, observaram efeito significativamente positivo da glutathione reduzida sobre a motilidade progressiva e a integridade da membrana plasmática. Entretanto, para os parâmetros de integridade de acrossoma e da morfologia espermática, hialuronidase e taurina, respectivamente, apresentaram resultados mais eficientes.

2.7 Avaliação da Fertilidade do sêmen

Tradicionalmente, o diagnóstico de fertilidade de um macho é realizado de acordo com a avaliação descritiva do sêmen, com ênfase no número de espermatozoides presentes no ejaculado, sua motilidade e morfologia. No entanto, muitos estudos têm demonstrado que esse conceito não possui efeito significativo na taxa de fertilidade, mas sua competência funcional. Com base nessa visão, tem sido desenvolvido um grande número de testes para avaliar vários aspectos da função espermática e prever a capacidade fertilizante do espermatozoide *in vivo* com certo grau de precisão. Dentre esses testes podem ser citados os que avaliam as características do movimento espermático, o potencial de membrana mitocondrial, a integridade de membrana plasmática e acrossomal, a capacitação e reação acrossomal, o reconhecimento da zona pelúcida, a fusão espermatozoide-ovócito, o grau de estresse oxidativo sofrido pelo espermatozoide e a integridade do seu DNA (MAIA, 2006).

Além disso, a avaliação da ultraestrutura dos espermatozoides de vertebrados e invertebrados tem sido estudada através da microscopia eletrônica de transmissão (LUQUE e BÁO, 2006), uma vez que os testes utilizados rotineiramente não permitem o acesso às alterações que acontecem em proporções subcelulares ou em escala nanométrica, havendo a necessidade da utilização da microscopia eletrônica (SARAIVA

et al., 2009), conforme demonstrado por Hashida et al. (2005), avaliando as ultraestruturas de espermatozoides caprinos frescos e criopreservados.

2.7.1 Análise da Integridade das Membranas Espermiáticas com Sondas Fluorescentes

Para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas normais. A presença de membranas íntegras é pré-requisito para os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermiática, penetração nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2007).

A tecnologia de coloração tem de certa forma possibilitado a avaliação da capacidade funcional de espermatozoides em várias espécies (HARRISON e VICKERS, 1990; COLETO et al., 2002; AZEVEDO, 2006; MAIA et al., 2009; BATISTA et al., 2009; SILVA et al., 2009a). A integridade da membrana é usualmente avaliada após a exposição dos espermatozoides a corantes impermeáveis à membrana, de maneira que os gametas não corados são considerados vivos. Atualmente muitos corantes usados são fluoróforos que reagem com enzimas citoplasmáticas ou ligam-se ao DNA (SILVA e GADELLA, 2006).

Várias sondas fluorescentes têm sido usadas e validadas para análise da integridade das membranas em espermatozoides de caprinos, como: diacetato de carboxifluoresceína (DCF) em combinação com iodeto de propídio (IP) (COLETO et al., 2002); corante ácido nucléico permanente (SYBR[®]14) em combinação com IP (PETERSON et al., 2007) e Hoechst 33258 (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006).

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

Coleto et al. (2002), utilizando o DCF em combinação com o IP para avaliação da viabilidade de espermatozoides descongelados de reprodutores caprinos da raça

Pardo Alpina, determinaram pequena correlação entre a técnica de fluorescência e a motilidade e o vigor espermáticos ($r = 0,1403$), e concluíram que tais corantes são eficientes para avaliar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides desta espécie.

Peterson et al. (2007), usando uma combinação de sondas fluorescentes (SYBR[®] 14/IP), estudaram a integridade das membranas de espermatozoides caprinos da raça Saanen e concluíram existir correlação entre a proporção de células com membranas intactas e a quantidade de espermatozoides móveis armazenados a 18 e 4 °C ($r = 0,77$ e $0,98$, respectivamente). Além disso, evidenciaram pequena correlação entre a porcentagem de espermatozoides vivos e a taxa média de partos ($r = 0,44$ a 18 °C; $r = 0,27$ a 4 °C).

As lectinas, proteínas que se ligam a carboidratos, têm sido marcadas com fluorescência para mapear a estrutura da superfície dos espermatozoides de mamíferos, sendo usadas para distinguir células com acrossomo reagido daquelas com acrossomo intacto. As lectinas mais utilizadas são as aglutininas derivadas do *Arachis hypogea* (PNA) e *Pisum sativum* (PSA) (VALCÁRCEL et al., 1997). Estas lectinas fluorescentes se ligam à membrana acrossomal externa (PNA) ou ao conteúdo acrossomal (PSA). O uso do PNA tem mostrado similaridade com o PSA em análise da integridade acrossomal de espermatozoide caprino submetidos à refrigeração ou congelamento (ABOAGLA e TERADA, 2004).

A mitocôndria tem sido objeto de estudos, sendo esta organela essencial para a fisiologia espermática e responsável pela produção de energia a partir da produção de ATP (adenosina trifosfato), possibilitando o movimento celular. Alterações no potencial de membrana mitocondrial podem interferir nas características espermáticas e na fertilidade masculina (CÂMARA e GUERRA, 2008). Deste modo, a integridade funcional das mitocôndrias é importante para a sobrevivência espermática no trato genital da fêmea (SILVA e GADELLA, 2006).

A capacidade de monitorar alterações no potencial de membrana mitocondrial das células pode ser crucial para elucidar mudanças da fisiologia celular em várias situações experimentais. Os reagentes mais comuns que são sensíveis ao potencial de membrana mitocondrial são as rodaminas e as carbocianinas. O sucesso do uso dessas sondas em células vivas deve-se ao fato de não serem destrutivas nem causarem toxicidade (REERS et al., 1991). A Rodamina 123 é uma molécula fluorescente catiônica que é transportada para dentro de mitocôndrias ativas de células vivas. O princípio dessa

sonda é que ela só é transportada e acumulada em mitocôndrias funcionalmente ativas, em função do potencial de transmembrana. A Rodamina 123 identifica somente uma população de células com função mitocondrial, não possuindo a capacidade de diferenciar mitocôndrias com alto ou baixo potencial de membrana (SALVIOLI et al., 1997). A sonda mitocondrial JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil carbocianina) existe como um monômero com excitação e emissão no comprimento de onda verde (510-520 nm). Entretanto, ele também exibe um segundo pico na faixa do vermelho-laranja (590 nm). O fenômeno que produz a fluorescência vermelha-laranja deve-se à formação de J-agregados. O JC-1 consegue identificar populações mitocondriais com diferentes potenciais de membrana. Mitocôndrias com alto potencial fluorescem em vermelho-laranja devido à formação de J-agregados (quando a concentração de JC-1 na mitocôndria aumenta, este corante forma agregados que fluorescem laranja), enquanto que aquelas mitocôndrias com baixo a médio potencial de membrana florescem em verde, devido ao fato do JC-1 no estado de monomérico fluorescem em verde (GARNER et al., 1997; GRAHAM, 2001; SILVA e GADELLA, 2006).

2.7.2 Análises da Cinética Espermática

Usualmente, a motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, com uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. Entretanto, estudos reportam que este tipo de análise é impreciso, mesmo quando executado por técnicos experientes. Esta imprevisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implantação de padrões para a avaliação (ARRUDA et al., 2007).

Na tentativa de diminuir esta imprevisão, grande atenção tem sido dada aos métodos objetivos de análise da motilidade espermática, entre eles a análise computadorizada (Computer Assisted Sêmen Analyses – CASA). Programas computadorizados para a avaliação espermática podem ser mais objetivos e imprimir maior repetibilidade às avaliações do que a habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de normalidade espermática das características seminais (ARRUDA et al., 2003).

De acordo com Verstegen et al. (2002), além da motilidade total (MT) e da motilidade progressiva (MP) outros parâmetros são reportados pelo CASA com relação a velocidade do espermatozoide: velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL - $\mu\text{m/s}$) e velocidade média do trajeto (VAP - $\mu\text{m/s}$). Cada uma descreve um aspecto diferente da trajetória do espermatozoide. A VCL é a distância percorrida pelo espermatozoide ao longo do caminho curvilíneo percorrido. A VSL é a distância em linha reta entre o primeiro e o último ponto da trajetória percorrida do espermatozoide. A VAP é a velocidade média da trajetória do espermatozoide. A amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide em sua trajetória (ALH - μm) está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, tendo efeito sobre a fertilização. A frequência de batimento flagelar (BCF - Hz) é o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento. A retilinearidade (STR - %) é a relação porcentual entre a VSL e a VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta. Uma trajetória com baixa amplitude teria uma elevada STR. A linearidade (LIN - %) é a relação porcentual entre a VSL e a VCL. Quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade. Uma trajetória circular teria uma baixa LIN.

Alguns valores dos parâmetros observados pelo sistema CASA têm sido correlacionados com eventos fisiológicos. O padrão de cinética do espermatozoide caracterizado por uma motilidade altamente progressiva associada a um significativo movimento lateral de cabeça tem sido correlacionado com a habilidade de penetrar no muco cervical (AITKEN et al., 1985).

Verstegen et al. (2002) atribuíram ao VCL e VAP atributos para predizer os resultados nos processos de fertilização, pois ambos se encontram aumentados após a capacitação espermática. No entanto, tem sido encontrada pouca relação entre os parâmetros mensurados pelo sistema CASA e alguns testes *in vivo* e *in vitro* usados para avaliar a qualidade do sêmen. O meio diluidor, debris celulares e impurezas dificultam a visualização e avaliação espermática (DAVIS e KATZ, 1992).

2.7.3 Análise Ultraestrutural dos Espermatozoides

Apesar dos avanços na microscopia eletrônica de transmissão (MET), existem poucos estudos apresentando uma descrição sistemática do espermatozoide caprino,

tanto em estado *in natura* quanto criopreservado. A MET tem ajudado a descrever a aparência ultraestrutural da célula espermática canina em amostras *in natura* e descongeladas, enfocando os danos induzidos pelo processo de congelação/descongelação em diferentes regiões espermáticas (SILVA et al., 2007). Os autores puderam concluir que o processo de criopreservação induziu danos ultraestruturais na cabeça e peça intermediária, afetando a estrutura básica das mitocôndrias. Da mesma forma, Hashida et al. (2005) também concluíram que o processo de criopreservação causou danos na morfologia do espermatozoide de caprino, com subsequente comprometimento da fertilidade.

Com base nas análises realizadas pela MET também é possível avaliar a ação de meios diluidores e crioprotetores no processo de congelação do sêmen sobre as características morfofuncionais celulares (CHIRINÉA et al., 2006). Landim-Alvarenga e Alvarenga (1997) demonstraram que a avaliação do sêmen de equino por meio de microscopia eletrônica de transmissão é caracterizada pela observação de grande heterogeneidade morfológica e pela presença de várias anomalias que não podem ser evidenciadas pela microscopia ótica convencional.

A popularização das técnicas de MET, na avaliação da infertilidade masculina humana e animal, proporcionam a formação de uma base sólida para o melhor entendimento dos processos fisiopatológicos e para uma melhor adequação das condutas terapêuticas a serem seguidas. Até o presente, muitos aspectos relacionados à infertilidade do macho continuam obscuros, sobretudo nos quadros envolvendo componentes genético-familiares, linha de pesquisa carente por mais estudos, especialmente no tocante à expressão gênica diferencial da espermatogênese, base inicial dos diversos quadros de infertilidade (CRESPILHO et al., 2006).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOAGLA, E.M.; TERADA, T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v. 62, p. 1160-1172, 2004.
- AGARWAL, R.A.; SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*, v. 9, p. 331-345, 2003.
- AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*, v. 57, p. 1801-1808, 2002.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 659-68, 1995.
- AITKEN, R, J; CLARKSON, J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 81, p. 59-469, 1987.
- AITKEN, R.J.; SUTTON, M.; WARNER, P.; RICHARSON, D.W.; Relationship between the movements characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona free hamster oocytes. *Reproduction and Fertility*, v.73, p.441-449, 1985.
- 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.
- ANCHORDOGUY, T.J.; RUDOLPH, A.S.; CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipides during freezing. *Cryobiology*, v. 24, p. 324-331, 1987.
- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Science Veterinariae*, v.31 (Suplemento), p. 226-227, 2003.
- ARRUDA, P.R.; ANDRADE, A.F.C.; CELEGHINI, E.C.C.; ZAFFALON, G.; TARRAGÓ, O.F.B. Avaliação de sêmen fresco e congelado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM CAPRINOS E OVINOS, 1, 2007, Gravatá, PE. *Anais...* Gravatá, CAROATÁ GENÉTICA, 2007. CD ROOM.

AZEVEDO, H.C. *Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoleico e à lactoalbumina*. 2006, 195p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*, v. 22, p. 1061-1069, 2001.

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

BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; WISCHRAL, A.; GUERRA, M.M.P. Efeito dos métodos *Swim-up* e Percoll sobre a viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, p. 409, 2009.

BAUDOT, A.; CAULA, C.; DUARTE, M.L.; FAUSTO, R Thermal study of simple aminoalcohol solution, *Cryobiology*, v. 44, p. 150-160, 2002.

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

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORNER, 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.

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

BORGES, J.C. *Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificantes na criopreservação de sêmen bovino*. 2003 56p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa – UFV – Viçosa, 2003.

BORGES, J.C. *Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e*

fecundação in vitro. 2008, 70p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

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

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

CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, p. 93-99, 2008.

CELEGHINI, E.C.C; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CHEMINEAU, P.; CAGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. *FAO Reproduction and Health Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations*, p. 115–161, 1991.

CHIRINÉA, I.H.; MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; TEBET, J.M.; PAPA, F.O.; LOPES, M.D. Características morfofuncionais do sêmen canino refrigerado e congelado, usando dois diferentes meios diluentes. *Ciência Animal Brasileira*, v. 7, p. 407-415, 2006.

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

CRISPILHO, A.M.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O. Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. *Ciência Rural*, v. 36, n. 5, 2006.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; AURELLWISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemistry Journal*, v. 242, p. 1-10, 1987.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*, v. 48, p. 831-841, 1997.

- DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Operational standards for CASA instruments. *Journal of Andrology*, v. 14, p. 385-395, 1992.
- DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINE, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviewed Reproduction*, v. 2, p. 48-54, 1997.
- DE LEEUW, F.E.; De LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v. 30, p. 32-44, 1993.
- DENVIREDDY, R.V.; SWALUND, D.J.; OLIN, T.; VINCENT, W.; TROEDSON, M.H.T.; BISCHOF, J.C.; ROBERTS, K.P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined used differential scanning calorimetry. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 222-231, 2002.
- DORADO, J; RODRIGUEZ, I.M.; HIDALGO, A. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, v. 15, p. 168-177, 2007.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Wellington:Butterworths, 1987. 194p.
- FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 251-260, 1996.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 1-16, 1997.
- 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.
- GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A.; COY, P.; MATÁS, M.; ROMAR, R.; RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm alter cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, v. 62, p. 290-701, 2004.
- GADEA, J.; GUMBAO, D.; CÁNOVAS, S.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; GRULLÓN, L.A.; GARDÓN, C. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *International Journal of Andrology*, p. 31, p. 40-49, 2007.

- GARDÓN, J.C.; RODRIQUEZ, J.A.; GADEA, J. Addition of reduced glutathione to thawing medium improved the sperm motility and reduced ROS generation in frozen ovine and caprine spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 18, p. 155, 2003.
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W. et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 57, n. 6, p. 1401-1406, 1997.
- GONZALEZ, C.I.M.; OBA, E.; BICUDO, S.D. Avaliação do sêmen ovino (*Ovis aries*) congelado em palhetas e “pellets” com diferentes meios diluidores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n. 3, p.280-281, 1999.
- GONZALEZ, C.I.M.; SOARES, A.T.; CUNHA, M.G.G. et al. *Reprodução assistida em caprinos: Inseminação artificial*. João Pessoa: EMEPA-PB, 2002. 42 p. il. (EMEPA-PB. Documentos, 39).
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary clinical of North American: equine practice*, v. 12, p. 131-147, 1996.
- GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n. 3-4, p. 239-247, 2001.
- GRIVEAU, J.F.; DUMONT, E.; RENARD, P. et al. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 103, p. 17-20, 1995.
- GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology*, v. 20, p. 61-69, 1997.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.E.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (Revisão de literatura). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 28, p. 187-195, 2004.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ed., New York: Oxford University Press, 1999. 936p.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 88, p. 343-352,1990.
- HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H.; MAT NORR, M. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrossome-reacted goat sperm. *Biomedical Research*, v.16, p.119-123, 2005.

- HUNTER, R.H.F.; HUANG, W.T.; HOLTZ, W. Regional influences of the fallopian tubes on the rate of boar capacitation insurgically inseminated gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 114, p. 17-23, 1998.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 1/3, p. 3-22, 2000.
- JONES, K.H.; SENEFT, J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate – propidium iodide. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 33, n. 1, p. 77-79, 1985.
- JORDÃO JÚNIOR, A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: Papel da Glutathiona reduzida e da Vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 31, p. 434-449, 1998.
- KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; FORTE, T. et al. Recycling of vitamin E in low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, v. 33, p. 385-97, 1992.
- KANEKO, T.; LUCHI, Y.; KAWACHIYA, S. et al. Alteration of glutathione reductase expression in female reproductive organs during the oestrous cycle. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 1410-1416, 2001.
- KNAPEN, M.F.C.M.; ZUSTERZEEL, P.L.M.; PETERS, W.H.M.; STEEGERS, E.A.P. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 82, p. 171-184, 1999.
- KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUMDER, G.C. Effect of amino acid on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using chemically defined model system. *Cryobiology*, v. 41, p. 21-27, 2001.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A. Microtubular defect in equine spermatozoa associated with infertility. *Equine Veterinary Journal*, v. 29, n. 6, p. 487-489, 1997.
- LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Interaction between Ca^{2+} , cycle 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human capacitation. *Journal of Andrology*, v. 19, p. 434-443, 1998.
- LEWIS, S.E.M.; STERLING, E.S.L.; YOUNG, I.S.; THOMPSON, W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile men. *Fertility and Sterility*, v. 67, p. 142-147, 1997.

- LIEBLER, D.C. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 23, p. 147-169, 1993.
- LORENZO, P.L.; CARNEIRO, G.F. Biotecnologia e as perspectivas de futuro para caprino-ovinocultura. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2, 2003. João Pessoa, PB. *Anais...* João Pessoa, PB: EMEPA, 2003. p. 353-60.
- LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Biology Reproductive*, v. 5, p. 5-17, 2005.
- LUQUE, M.C.A.; BÁO, S.N. Structural and ultrastructural characterization of Zebu (*Bos indicus*) spermatozoa. *Biocell*, v. 30, n. 1, p. 33-38, 2006.
- MAAS, D.H.A.; STOREY, B.T.; MASTROIANNI, L. Oxygen tension in oviduct of the Rhesus monkey (*macaca mulatta*). *Fertility and Sterility*, v. 27, p. 1312-1318, 1976.
- MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB Journal*, v. 1, p. 441-445, 1987.
- MAIA, M.S. *Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-C e catalase*. 2006, 165p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; SICHERLE, C.C.; SOUZA, D.B.; RODELO, R. 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.
- MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; BALASCH, S.; MOCÉ-E.; SILVESTRE, M.A.; GOMEZ, E.A., VICENTE, J.S. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Criobiology*, v. 52, p. 295-304, 2006.
- MAZUR, P. Basic concepts in freezing cell. In: *Proceedings First International Conference on Deep Freezing of Boar Semen*. Johnson, L.A.; Larsson, K.L. (eds.) Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, p. 91-112, 1985.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v. 57, p. 327-344, 2002.
- MONTEIRO, J.C.; GONSALVES, J.S.A.; RODRIGUES, J.A.; LÚCIO, C.F.; SILVA, L.C.G.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VANNUCCHI, C.I. Influence of Ascorbic Acid and

glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 44 (suppl. 2), p. 359-362, 2009.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by a easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

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.

OLIVEIRA, E.C.S. *Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino*. 2003, 61p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte.

ONOFRE, F.C.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A.; FRENEAU, G.E.; Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 38, p. 33-38, 2002.

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

PEIXOTO, A.L.V.A; MONTEIRO JÚNIOR, P.L.J.; CÂMARA, D.R.; VALENÇA, R.M.B.; 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. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 11, p. 16-24, 2008.

PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 85-98, 2003.

PETERSON, K.; KAPPEN, M.A.P.M.; URSEM, P.J.F.; NÖTHLING, J.O.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: Effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology*, v. 67, p. 863-871, 2007.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v. 63, p. 215-225, 2006.

- REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, v. 30, n. 18, p. 4480-4486, 1991.
- RITAR, A.J.; BALL, P.D.; O'MAY, P.J. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 2, p. 27-34, 1990.
- RODRIGUÉZ-MARTINÉZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, p. 91-101, 2007.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, v. 23, p. 737-752, 2002.
- SARAIVA, K.L.A.; SILVA, A.K.S.E.; WANDERLEY, M.I. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 90, p. 454-462, 2009.
- SARLOS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, 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.
- SEIDEL, G.E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: THECNQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS, 1996, Fort Collins. *Anais...* Fort Collins: Colorado State University, p. 6-16, 1996.
- SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.R.; THOMAS, A.J.; JR AGARWAL, A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Human Reproduction*, v. 14, p. 2801-2807, 1999.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*, v. 25, p. 5-18, 2004.
- SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; LOPES, M.D. Descrição de danos ultra-estruturais em espermatozoides caninos criopreservados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba-PR. *Anais...* Belo Horizonte-MG: CBRA, v. 1, p.168, 2007.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SILVA, K.M.G.; MORAES, T.A.P.; ILVA, E.C.B.; GAMBOA, S.C.; GUERRA, M.M.P. Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides equinos após descongelção. *Arquivo*

Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 61, n.1. Belo Horizonte, Scielo Brasil, 2009.

SILVA, S.V.; BATISTA, A.M.; SOARES, A.T.; WISCHRAL, A.; GUERRA, M.M.P. Uso de sondas fluorescentes para avaliação da viabilidade de espermatozoides congelados de caprinos utilizando diluentes à base de gema de ovo e leite desnatado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, p. 398, 2009a.

SIMPLÍCIO, A.A. Inseminação artificial em caprinos: estágio atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 19, n. 1-2, p. 61-72, 1995.

SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SING, B.K.; PRASAD, R.L. The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science*, v. 41, p. 237-43, 1996.

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

URNER, F.; SAKKAS, D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction*, v. 125, p. 17-26, 2003.

URNER, F.; LEPPENS-LUISIER, G.; SAKKAS, D. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse the influence of glucose. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 1350-1357, 2001.

UYSAL, O.; BUCAK, M.N.; YAVAS, I.; VANISH, Ö. Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 12, p. 1362-1366, 2007.

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

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

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

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

WHITE, D.R.; AITKEN, R.J. Relationship between calcium, cycle AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Research*, v. 22, p. 163-177, 1989.

WILHELM, K.M.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. *Cryobiology*, v. 33, p. 320-329, 1996.

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

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, v. 54, p. 579-585, 2000.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urology*, v. 55, n. 6, p. 922-26. 2000.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 Avaliação *in vitro* de espermatozoides caprinos criopreservados em diluente à base de leite desnatado acrescido de Trolox

In vitro evaluation of goat spermatozoa after freezing in skimmed milk diluent supplemented with Trolox

Adriana Trindade Soares^{1,2}, Sildivane Valcácia Silva¹, Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Júnior¹, André Mariano Batista¹, José Ferreira Nunes³,
Christina Alves Peixoto⁴, Maria Madalena Pessoa Guerra¹

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

Autor para correspondência: mpguerra@dmv.ufrpe.br

²Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – EMEPA/PB;

³Laboratório de Tecnologia do Sêmen, UECE, Fortaleza, CE;

⁴Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) – Recife, PE.

RESUMO

Objetivando-se avaliar *in vitro* o efeito da adição de diferentes concentrações de Trolox (análogo da vitamina E) ao diluente de congelação de sêmen caprino, à base de leite desnatado e glicerol 7%, na integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial da membrana mitocondrial, cinética e análise ultraestrutural (MET) de espermatozoides descongelados, utilizou-se sêmen de cinco reprodutores da raça Boer, colhido com vagina artificial, em seis repetições. Após avaliação de cada ejaculado, procedeu-se à formação do *pool* dos ejaculados e diluição (240×10^6 espermatozoides/mL) em leite desnatado e glicerol 7%, acrescido de antioxidantes: G1) Controle; G2) Trolox 30 μ M/mL; G3) Trolox 60 μ M/mL; G4) Trolox 120 μ M/mL. Em seguida, as amostras de sêmen foram acondicionadas em palhetas (0,25mL), congeladas e armazenadas em botijão criobiológico. Após descongelação (37°C/30 segundos), alíquotas de sêmen de cada grupo foram avaliadas quanto a integridade de membrana plasmática (iMP) e acrossomal (iAc), potencial de membrana mitocondrial (PMM), cinética e ultraestrutura. A ultraestrutura foi avaliada em amostras de sêmen *in natura* e pós-descongelação. As análises de iMP, iAc, PMM e cinética espermática dos espermatozoides caprinos criopreservados não evidenciaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos Controle e Trolox (30, 60 e 120 μ M/mL). A análise ultraestrutural evidenciou que os percentuais de acrossoma, membrana plasmática da região da cauda e axonema íntegros não diferiram ($P > 0,05$) entre grupos (Controle e Trolox 30, 60 e 120 μ M/mL), mas foram inferiores ($P < 0,05$) aos do sêmen *in natura*. Entretanto, as amostras dos grupos Trolox 60 μ M/mL e Trolox 120 μ M/mL apresentaram maior porcentagem ($P < 0,05$) de espermatozoides com membrana plasmática intacta na região da cabeça do que as dos grupos Controle e Trolox 30 μ M/mL, mas não diferiram ($P > 0,05$) do sêmen *in natura*. Maior porcentagem ($P < 0,05$) de espermatozoides com mitocôndrias intactas foi observada nas amostras de sêmen *in natura*, e dos grupos Controle e Trolox 60 μ M/mL do que naquelas do Trolox 30 μ M/mL e 120 μ M/mL. Com

base na análise ultraestrutural, é possível concluir que Trolox 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$ pode ser adicionado ao diluente de congelação de sêmen caprino, à base de leite desnatado e glicerol 7%, visando preservar a integridade da membrana plasmática na região da cabeça dos espermatozoides.

Palavras chave: antioxidantes, sêmen, viabilidade espermática.

ABSTRACT

Aiming to evaluate in vitro effect of different concentrations of Trolox (vitamin E analogue) in skimmed-milk and glycerol 7% diluent on the plasma membrane (iPM) and acrosome (iAc) integrity, mitochondrial membrane potential (MMP), kinematic and ultrastructural analyses of thawed goat sperm, it were used semen samples from five Boer bucks collected by artificial vagina in six replicates. After analysis of each ejaculate, pool of ejaculate samples was diluted (240×10^6 sperm/mL) in skimmed-milk plus glycerol 7% supplemented with antioxidants, according to experimental groups: G1) control, G2) Trolox 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$; G3) Trolox 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$, G4) Trolox 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$. The samples were packed in straws (0.25 mL), frozen and stored in Liquid Nitrogen (-196 °C). After thawing (37 °C/30 seconds), semen aliquots of each group were submitted to iPM, iAc, MMP, kinematic and ultrastructure analysis. The iPM, iAc, PMM and kinematic parameters showed no significant difference ($P > 0.05$) among groups. In ultrastructural analysis, acrosome, plasma membrane on the tail region and axoneme integrity did not differ ($P > 0.05$) among groups, but they were observed in lower ($P < 0.05$) percentage than those of fresh samples. However, Trolox 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$ and Trolox 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$ groups had higher ($P < 0.05$) percentage of sperms with intact plasma membrane on the head region than control and Trolox 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$ groups, but they did not differ ($P > 0.05$) of the fresh samples. Higher percentage ($P < 0.05$) of sperms with intact mitochondrias were observed on fresh, control and Trolox 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$ samples than those of Trolox 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$ and 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$. Based on ultrastructural analysis, it can be concluded that Trolox 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$ can be used in skimmed-milk plus glycerol 7% diluent to preserve the integrity of sperm plasma membrane on the head region.

Keywords: antioxidants, semen, sperm viability.

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial (IA) são utilizadas na indústria caprina com os objetivos de acelerar o ganho genético de animais com grande potencial zootécnico e de superar alguns obstáculos da eficiência reprodutiva (LORENZO e CARNEIRO, 2003). Apesar das inúmeras vantagens, a IA em caprinos ainda é pouco aplicada devido aos resultados ainda incipientes do uso do sêmen congelado/descongelado (GONZALEZ et al., 2002).

Os procedimentos de congelação/descongelação do sêmen ocasionam danos celulares devido à mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozoide, lesões no DNA, estresse osmótico e toxicidade dos crioprotetores (BALL e VO, 2001), resultando em alterações ultraestruturais, bioquímicas e funcionais que diminuem a viabilidade deste gameta.

Além disso, durante a manipulação, os espermatozoides são expostos ao oxigênio e várias etapas de seu processamento podem promover o aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (WATSON, 2000). Em concentração reduzida, as ROS são necessárias para que o espermatozoide adquira a capacidade fecundante (BAUMBER et al., 2003). No entanto, concentrações elevadas destas substâncias no sêmen podem afetar o metabolismo, a motilidade, a viabilidade e a integridade do DNA espermático de várias espécies (BILODEAU et al., 2002). Atualmente, o pouco conhecimento da ação de oxidantes e antioxidantes encontrados no sêmen dos animais domésticos talvez seja responsável pelos resultados insatisfatórios obtidos após a congelação espermática de algumas espécies e posterior utilização em técnicas de reprodução assistida, como IA e fertilização *in vitro*.

Desta forma, a elaboração de protocolos de congelação utilizando substâncias que possam atuar na proteção das células espermáticas contra os efeitos oxidativos ocorridos na criopreservação do sêmen (VALENÇA e GUERRA, 2007) podem contribuir para a otimização do uso destas biotécnicas reprodutivas (GUERRA et al., 2004). Acredita-se que a vitamina E (α -tocoferol e seus derivados) seja o inibidor primário das ROS encontradas em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos e no plasma seminal (SIKKA, 2004), protegendo as células do estresse oxidativo *in vivo* e *in vitro* (KAGAN et al., 1992). O Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico), análogo sintético da vitamina E, é uma substância hidrossolúvel, com potente propriedade antioxidante (WU et al., 1990), envolvendo o \cdot OH fenólico e a remoção de radicais peroxil (ALBERTINI e ABUJA, 1999).

Neste sentido, objetivou-se com este trabalho avaliar *in vitro* o efeito de diferentes concentrações de Trolox em meio de congelação de sêmen à base de leite desnatado e glicerol 7% na integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial da membrana mitocondrial, cinética e análise ultraestrutural (MET) de espermatozóides descongelados de caprinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados no experimento foram obtidos da Sigma Aldrich Co.[®] (St. Louis, MO, USA).

2.1 Origem do sêmen

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Boer, com fertilidade comprovada e idade variando de 24 a 36 meses. Os animais foram submetidos a regime intensivo, alimentados com 400g/dia de concentrado comercial, além de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado no cocho, sal mineral e água *ad libitum*. As colheitas de sêmen foram realizadas com auxílio de vagina artificial e presença de uma fêmea como manequim. Foram obtidos seis ejaculados de cada reprodutor, obedecendo a frequência de três colheitas por semana, correspondendo a 30 amostras de sêmen.

2.2 Diluição e congelamento do sêmen

Após colheita, as amostras de sêmen foram submetidas a avaliação, selecionando-se aqueles com motilidade $\geq 70,0\%$ e vigor ≥ 3 . Em seguida, procedeu-se à formação do *pool* de ejaculados, o qual foi centrifugado duas vezes (2500 g; 10 minutos) em tampão Tris (3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose, 100 mL de água bidestilada; pH 6,8), na proporção de 1:9 (v:v; sêmen:solução de lavagem).

A seguir, o *pool* dos ejaculados foi diluído em leite desnatado e glicerol (7%) acrescido de antioxidantes, de acordo com o grupo experimental, na concentração de 240×10^6 espermatozoides/mL: G1) Controle; G2) Trolox 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$; G3) Trolox 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$; e G4) Trolox 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$.

Após a diluição, as amostras foram acondicionadas em palhetas (0,25 mL) e submetidas à refrigeração e congelamento em sistema automatizado (modelo TK 3000[®] - TK Tecnologia em Congelamento LTDA, Uberaba, Brasil), na curva de congelamento rápida (- 0,25 °C/min, de 25 °C a 5 °C, e a - 20 °C/min, de 5 °C a -120 °C), e, após atingir a temperatura de -120 °C, as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

2.3 Descongelamento e análise espermática

Após descongelamento (37 °C, por 30 segundos), alíquotas de sêmen de cada grupo foram avaliadas quanto à integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial da membrana mitocondrial, cinética e ultraestrutura espermática.

Integridade da membrana plasmática

Utilizou-se o método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e Iodeto de Propídio (IP), de acordo com Coletto et al. (2002). Alíquotas de 50 µL de sêmen foram diluídas em 150 µL de Tris contendo 5 µL de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 µL de IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos a 38 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), com aumento de 400 x usando filtro de emissão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485/20nm, e classificados como membrana intacta quando se apresentavam corados em verde ou como membrana danificada quando corados em vermelho.

Integridade do acrossoma

Os espermatozoides foram corados com isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA), de acordo com técnica descrita por Roth et al. (1998). Alíquotas de 5 µL de sêmen foram preparadas para esfregaço e secadas ao ar. Uma alíquota de 100 µL da solução estoque de FITC-PNA (1 mg/mL) foi descongelada e adicionada a 900 µL de PBS para obter a concentração final de 100 µg/mL. Alíquotas (10 µL) desta solução foram colocadas sobre lâminas, as quais foram incubadas por 15 minutos em câmara úmida a 4 °C, na ausência de luz. Após incubação, as lâminas foram submetidas a duas lavagens em PBS refrigerado (4 °C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 µL de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de p-phenylenediamine) foi colocado sobre lâmina e coberto com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000 x, sob óleo de imersão, em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os gametas foram classificados como portadores de acrossomas intactos,

quando apresentaram a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou acrossoma reagido, quando apresentavam uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda região da cabeça.

Potencial da membrana mitocondrial

A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE e WELCH, 2006). Alíquotas de 50 μL de sêmen foram diluídas em 150 μL de Tris, contendo 5 μL de JC-1 (0,15 mM em DMSO), incubadas por 10 minutos a 38 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), com aumento de 1000 x sob óleo de imersão usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

Cinética

Alíquota de 5 μL da amostra de sêmen foi depositada na câmara de Mackler, mantida a 37 °C e examinada em microscópio de contraste de fase (100x) acoplado ao sistema computadorizado de análise espermática (CASA; Sperm Class Analyzer, Microptics, S.L. Version 3.2.0 Barcelona, Spain). Observou-se os parâmetros de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), oscilação (WOB, %), amplitude de deslocamento da cabeça (ALH, μm), frequência do batimento de flagelo (BCF, Hz), segundo Verstegen et al. (2002).

Ultraestrutura

A identificação de danos na ultraestrutura espermática foi realizada por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Amostras de sêmen *in natura* e congeladas/descongeladas foram centrifugadas três vezes (800 g; 5 minutos) em solução

tampão (PBS) e fixadas *overnight* em solução contendo Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 2,5% e tampão Cacodilato de Sódio 0,1M. Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas numa solução contendo Tetróxido de ósmio 1%, CaCl_2 2 mM e de Ferricianeto de Potássio 0,8% em tampão Cacodilato 0,1 M (pH 7,2). Em seguida, as amostras foram novamente lavadas em tampão Cacodilato e submetidas a contrastação em bloco com Acetato de Uranila 2,5%.

A seguir, as amostras de sêmen foram desidratadas em séries crescentes de acetona, infiltradas e emblocadas em resina SPIN-PON. A polimerização foi feita a 60 °C por 72 horas. Cortes ultrafinos foram coletados em grades de níquel de 300-mesh e contrastados com 5% de Acetato de Uranila e Citrato de Chumbo, segundo as recomendações de Saraiva et al. (2009). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgani 268D (FEI Company, Eindhoven, Netherlands).

2.4 Análise estatística

Foi utilizado o modelo estatístico $Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$, em que Y_{ij} = valor observado de cada variável estudada j ; μ = média geral da população; T_i = efeito do tratamento i ; e ε_{ij} = erro aleatório associado a cada observação. Os dados das variáveis estudadas foram submetidos à análise de variância, obedecendo a um delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se o teste F para comparação dos quadrados médios dos fatores testados e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o procedimento PROC CORR do programa SAS (2001).

3 RESULTADOS

A integridade da membrana plasmática e do acrossoma, o alto potencial da membrana mitocondrial (Tabela 1) e a cinética (Tabela 2) de espermatozóides caprinos submetidos à congelação não evidenciou diferença significativa ($P > 0,05$) entre o grupo Controle e os grupos de Trolox (30, 60 e 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$).

Na análise quantitativa da ultraestrutura de espermatozóides caprinos (Tabela 3) constatou-se maiores percentuais ($P < 0,05$) de células com membrana plasmática íntegra na região da cabeça nas amostras de sêmen *in natura* e congeladas em leite desnatado e glicerol 7% acrescido de Trolox 60 e 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$, quando comparadas àquelas dos

grupos Controle e Trolox 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$. Maiores percentuais ($P < 0,05$) de gametas com acrossoma, membrana plasmática na região da cauda e axonema íntegros foram observado nas amostras de sêmen *in natura*, quando comparadas àquelas congeladas (Controle, Trolox 30, 60 e 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$), as quais não diferiram entre si. Todavia, maiores percentuais ($P < 0,05$) de espermatozóides com mitocôndrias intactas foram observados nas amostras *in natura* e dos grupos Controle e Trolox 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$.

A análise qualitativa da ultraestrutura de espermatozóides caprinos obtidos das amostras de sêmen *in natura* constatou que o dano mais freqüente foi membrana plasmática rompida, evidenciando perda de material acrossomal (Figura 1A). Todavia, a peça intermediária apresentou-se bem estruturada, evidenciando organização de suas organelas (Figura 1B).

Nas amostras de sêmen criopreservadas dos grupos Controle e Trolox 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$ observou-se grande quantidade de células com membrana plasmática apresentando edema, ondulações e rompimento, além de células apresentando reação do acrossoma (Figura 1C). Também foi observado nas amostras do grupo tratado com Trolox 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$ células com a peça intermediária apresentando lesão nas mitocôndrias e desorganização destas estruturas (Figura 1D).

Nas amostras congeladas com Trolox 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$ observou-se grande número de espermatozoides apresentando membrana plasmática e acrossomal íntegras (Figura 1E). Enquanto as amostras de sêmen congeladas com Trolox 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$ evidenciou células com edema de membrana plasmática na região da cabeça (Figura 1F).

4 DISCUSSÃO

A avaliação por sondas fluorescentes das amostras descongeladas de sêmen caprino dos grupos Controle e Trolox (30, 60 e 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$), apesar de não diferirem estatisticamente, apresentaram percentuais numericamente maiores de gametas com membrana plasmática intacta na presença de Trolox 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$, e com acrossomas íntegros na presença de Trolox 30 e 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$, quando comparadas às amostras do grupo Controle. Este resultado pode ser justificando pela ação benéfica da adição da vitamina E em proteger as membranas espermáticas contra o estresse oxidativo (KAGAN et al., 1992), por ser um inibidor primário de radicais livres nestas estruturas celulares de mamíferos (SIKKA, 2004) e ser uma substância hidrossolúvel facilmente

distribuída na bicamada de lipídios das biomembranas, tornando-o um excelente protetor contra a lipoperoxidação (BARCLAY et al., 1995).

Todavia, ao se aumentar a concentração deste antioxidante para 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$, observou-se porcentagem numericamente menor de gametas com membrana plasmática e acrossomas íntegros do que nas amostras do grupo Controle. Estes resultados indicam a necessidade de mais estudos visando adicionar Trolox em concentrações maiores do que 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$ e menores do que 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$, uma vez que, dependendo da concentração administrada *in vitro* (BOLLE et al., 2002) e dos compostos presentes na reação, a vitamina E pode exercer efeito anti ou pró-oxidativo (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999). Fato constatado por Maia et al. (2007), ao observarem que a concentração de Trolox $> 100\mu\text{M}/10^8$ espermatozoides foi deletéria ao espermatozoide ovino.

A adição de Trolox, nas concentrações de 30, 60 e 120 M/mL , reduziu numericamente o percentual de espermatozoides caprinos, submetidos à congelação, com alto potencial de membrana mitocondrial, em comparação ao grupo Controle. No entanto, devido ao fato da membrana da cauda do espermatozoide ser mais resistente a danos do que o acrossoma e a membrana plasmática que envolve a cabeça desta célula (SALAMON e MAXWELL, 1995) e que algumas enzimas antioxidantes se encontram em maior concentração na peça intermediária (KNAPEN et al., 1999), esperava-se que a adição deste antioxidante não alterasse o percentual de gametas com alto PMM. Todavia, o valor médio de espermatozoides com alto PMM obtido neste estudo ($47,45 \pm 9,30\%$) foi semelhante aos 40,33% relatados por Batista et al. (2009), estudando a viabilidade de espermatozoides caprinos da raça Boer criopreservados utilizando o mesmo protocolo do presente estudo.

Na análise da cinética espermática, pós-descongelação, observou-se motilidade total destes gametas acima de 70% e motilidade progressiva abaixo de 30%, em todos os grupos experimentais (Controle e Trolox 30, 60 e 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$). Este resultado evidencia que o processo de congelação causou pequena redução no percentual de gametas vivos, segundo Leboeuf et al. (2000) e Watson (2000), ao relatarem que 10 a 50% da população total de espermatozoides não sobrevivem ao processo de congelação e morrem. Todavia, a criopreservação afetou o potencial de fertilização deste gameta, onde se observou redução de 42,50% no percentual de espermatozoides com motilidade progressiva nas amostras de sêmen submetidas à congelação, provavelmente devido à ocorrência de danos subletais às células vivas, que diminuem a habilidade destes

gametas interagirem com o trato feminino (PESCH e BERGMANN, 2006). Estes resultados sugerem que as amostras de sêmen se encontravam em desequilíbrio entre as concentrações de ROS e as de antioxidantes endógenos (GUERRA et al., 2004). Além disso, o resultado da MT corrobora com os relatos de Maia et al. (2007), ao relatarem que o efeito do Trolox sobre a motilidade de espermatozoides ovinos pós-descongelção foi dose-dependente e variou conforme a congelabilidade do sêmen, uma vez que a concentração de 50 a 100 $\mu\text{M}/10^8$ espermatozoides produziu efeito positivo sobre a motilidade total, enquanto concentrações acima de 100 $\mu\text{M}/10^8$ espermatozoides reduziu o porcentual de gametas vivos. Entretanto, os resultados da MT obtida por Davis e Katz (1992) foram consideravelmente inferiores (38,37 \pm 11,2%) àqueles encontrados neste estudo (77,22 \pm 18,56%).

Optou-se por adicionar o antioxidante Trolox ao diluente de congelação de sêmen caprino, em virtude de esta substância ser um análogo sintético da vitamina E e principal antioxidante de membrana (BARCLAY et al., 1995). Assim, visava-se proteger as células espermáticas do estresse físico às membranas, considerado o fator mais limitante da capacidade fertilizante deste gameta, e dos danos morfológicos ou bioquímicos, que frequentemente resultam em disfunção espermática (PESCH e BERGMANN, 2006). Todavia, não foi evidenciada diferença estatística ($P > 0,05$) na cinética dos espermatozoides caprinos criopreservados, apesar de se observar que nos parâmetros MT, LIN, WOB, VSL e VAP os valores foram numericamente maiores à medida que se aumentou a concentração deste antioxidante. Em contrapartida, nos parâmetros STR, ALH e BCF foram obtidos menores resultados ao se aumentar a concentração de Trolox.

Analisando-se os valores obtidos nas velocidades do movimento espermático, constata-se que tais parâmetros encontram-se abaixo da média dos resultados observados na literatura, utilizando a concentração de 20 x 10⁶ espermatozoides/mL na espécie caprina (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006; SUNDARARAMAN e EDWIN, 2008; DORADO et al., 2009). Ressalta-se que neste estudo utilizou-se 50 x 10⁶ espermatozoides/mL e que, segundo Davis e Katz (1992), concentrações muito baixas (<20 x 10⁶/mL) ou muito altas (> 50 x 10⁶/mL) interferem negativamente nas avaliações da cinética espermática pelo CASA. Todavia, a análise da cinética de espermatozoides caprinos da raça Boer, em trabalhos anteriormente realizados (dados não publicados), apresentou valores inferiores aos deste estudo, onde se utilizou a mesma concentração espermática (50 x 10⁶/mL).

Outro fato a considerar é que a congelação das amostras de sêmen caprino não determinou hiperativação das células espermáticas das amostras dos grupos Controle e tratados com Trolox (30, 60 e 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$), uma vez que, segundo classificação de Mortimer e Maxwell (1999), não apresentam valores de $\text{VCL} > 250,0 \mu\text{m}/\text{s}$, $\text{VSL} \leq 100,0 \mu\text{m}/\text{s}$, $\text{LIN} \leq 30\%$ e $\text{ALHmax} \geq 9,0 \mu\text{m}/\text{s}$. No entanto, com base nos resultados das avaliações por sondas fluorescentes, esperava-se que estes gametas apresentassem sinais de hiperativação (WATSON, 1995), devido à ocorrência de danos na membrana plasmática determinados pela congelação (CHECK e CHECK, 1991), resultando na antecipação da maturação das membranas espermáticas e aumento da proporção de espermatozoides capacitados ou com acrossomo reagido, quando comparados aos do sêmen *in natura* (MAXWELL e WATSON, 1996).

A análise por MET da membrana plasmática na região da cabeça do espermatozoide demonstrou a ação benéfica do Trolox (60 e 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$), em relação às amostras do grupo Controle, provavelmente devido ao fato do grupo hidroxila (-OH) presente na composição deste antioxidante ter reagido com elétrons desemparelhados, interrompendo a reação em cadeia da lipoperoxidação (LIEBLER, 1993), e ser um inibidor primário de radicais livres encontrados em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos e no plasma seminal (SIKKA, 2004). Ressalta-se, no entanto, que o fato da adição de Trolox 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$ não ter aumentado o percentual de gametas com membrana íntegra na região da cabeça pode ser explicado pelo fato da concentração administrada ter, provavelmente, determinado efeito pró-oxidante (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999; BOLLE et al., 2002).

Todavia, esperava-se que o Trolox também proporcionasse efeito protetor do estresse oxidativo em outras regiões da célula espermática, como acrossoma, axonema e membrana plasmática da região da cauda. Esta diferença na ação da substância antioxidante pode ser justificada pelo fato da membrana plasmática que envolve todo o espermatozoide ser constituída por glicoproteínas específicas e lipídios, de acordo com a região espermática, conhecida como domínio de superfície, importante para a função desta membrana (TÖPFER-PETERSEN e WABERSKI, 2001).

A análise por MET da estrutura das mitocôndrias evidenciou que a adição de Trolox não aumentou o percentual destas organelas íntegras, em relação ao grupo Controle. Todavia, nas concentrações de 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$ e 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$, provavelmente ocorreu efeito pró-oxidante, ratificando as observações de Brigelius-Flohé e Traber

(1999) e Bolle et al. (2002). Na concentração de 60 μ M/mL, o Trolox proporcionou resultado semelhante àquele obtido nas amostras de sêmen *in natura* e do grupo controle, sugerindo que a adição de concentração maior do que 60 μ M/mL e menor do que 120 μ M/mL possa ter ação benéfica e que deve ser objeto de mais estudos.

Os resultados da análise por MET ratificam a avaliação realizada com sondas fluorescentes (DCF/IP), onde se constatou porcentual numericamente maior de espermatozoides caprinos com membrana plasmática íntegra nas amostras criopreservadas com Trolox 60 μ M/mL, em relação ao grupo Controle e demais grupos experimentais, apesar de não haver sido encontrado diferença estatística.

Nas amostras de sêmen *in natura*, a análise por MET também demonstrou danos na estrutura dos espermatozóides caprinos. Esta observação pode ser explicada pelo fato de um ejaculado ser composto de várias subpopulações de células, podendo apresentar gametas que apresentem diferentes épocas de maturação, ocasionando envelhecimento e perda da viabilidade celular (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Da mesma forma, as amostras de sêmen do grupo Controle apresentaram mais de 30% de gametas com perda da integridade de membrana plasmática (nas regiões de cabeça e cauda), acrossoma, axonema e mitocôndrias. Este fato também foi observado por Hashida et al. (2005), onde relataram que o processo de criopreservação danifica a morfologia espermática com subsequente comprometimento da fertilização.

5 CONCLUSÃO

Com base na análise ultraestrutural, é possível concluir que Trolox 60 μ M/mL pode ser adicionado ao diluente de congelação de sêmen caprino, à base de leite desnatado e glicerol 7%, visando aumentar a integridade da membrana plasmática na região da cabeça dos espermatozoides. Todavia, recomenda-se a realização de novos estudos testando o efeito desta substância na taxa de fertilidade de cabras inseminadas.

6 AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante a realização do Doutorado; à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro; e a Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA/PB), pela autorização de uso dos reprodutores.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, R.; ABUJA, P.M. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radical Research*, v. 30, n. 3, p. 181-188, 1999.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*, v. 22, p. 1061-1069, 2001.
- BARCLAY, L.R.C.; ARTZ, J.D.; MOWAT, J.J. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: ¹⁴C tracer and product studies. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1237, p. 77-85, 1995.
- BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; WISCHRAL, A.; GUERRA, M.M.P. Efeito dos métodos *Swim-up* e Percoll sobre a viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, p. 409, 2009.
- BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 60, p. 1239-1247, 2003.
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORNER, 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.
- BOLLE, P.; EVANDRI, M.G.; SASO, L. The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. *Contraception*, v. 65, p. 313-315, 2002.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, v. 13, p. 1145-1155, 1999.

- CHECK, M.L.; CHECK, J.H. Poor hypo-osmotic swelling test results from cryopreserved sperm despite preservation of sperm motility. *Archives of Andrology*, v. 26, p. 37-41, 1991.
- COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 24, p.101-104, 2002.
- DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Operational standards for CASA instruments. *Journal of Andrology*, v. 14, p. 385-395, 1992.
- DORADO, J.; HIDALGO, M.; MUÑOZ, A.; RODRÍGUEZ, I. Assesment of goat sêmen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal Reproduction Science*, v. 112, p. 150-157, 2009.
- GONZALEZ, C.I.M.; SOARES, A.T.; CUNHA, M.G.G. et al. *Reprodução assistida em caprinos: Inseminação artificial*. João Pessoa: EMEPA-PB, 2002. 42 p. il. (EMEPA-PB. Documentos, 39).
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.E.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de literatura). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 28, p. 187-195, 2004.
- GUTHRIE, H.D.; WELCH G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*, v. 84, p. 2089-2100, 2006.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7ª Ed, São Paulo: Editora Manole, 2004. 513p.
- HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H.; MAT NORR, M. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrossome-reacted goat sperm. *Biomedical Research*, v.16, p.119-123, 2005.
- KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; FORTE, T. et al. Recycling of vitamin E in low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, v. 33, p. 385-97, 1992.
- KNAPEN, M.F.C.M.; ZUSTERZEEL, P.L.M.; PETERS, W.H.M.; STEEGERS, E.A.P. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 82, p. 171-184, 1999.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 113–141, 2000.

- LIEBLER, D.C. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 23, p. 147-169, 1993.
- LORENZO, P.L.; CARNEIRO, G.F. Biotecnologia e as perspectivas de futuro para caprino-ovinocultura. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2, 2003. João Pessoa, PB. *Anais...* João Pessoa, PB: EMEPA, 2003. p. 353-60.
- MAIA, M.S.; SICHERLE, C.C.; BICUDO, S.D.; SOUZA, S.D.; AZEVEDO, H.C. Effect of Trolox addition on the motility and membrane integrity of ram spermatozoa with high and low freezability. In: 7th International Ruminant Reproduction Symposium, 2006, Wellington. *Reproduction in Domestic Ruminant VI*. Wellington - NZ : Nottingham university press, 2007. v. 64. p. 467-467.
- MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; BALASCH, S.; MOCÉ, E.; SILVESTRE, M.A.; GOMEZ, E.A.; VICENTE, J.S. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*, v. 52, p. 295-304, 2006.
- MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 55-65, 1996.
- MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 11, p. 25-30, 1999.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, v. 37, p. 597-612, 2006.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, J.L.; BUSH, L.M.L.; WILDT, D.E.; BUSH, M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). *Biology of Reproduction*, v.58, p.475-482, 1998.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen insemination processing freezing, thawing and fertility after cervical insemination (review). *Animal Reproduction Science*, v. 37, p. 185-249, 1995.
- SARAIVA, K.L.A.; SILVA, A.K.S.E.; WANDERLEY, M.I. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 90, p. 454-462, 2009.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal Andrology*, v. 25, p. 5-18, 2004.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. *SAS/STAT: user's guide*, Version 6, 4.ed., v.2, Cary: SAS Institute, 2001. (CD-ROM).

SUNDARARAMAN, M.N.; EDWIN, M.J. Changes in motility characteristics of goat spermatozoa during glycerol-equilibration and the relevance to cryopreservation. *Asian Journal of Cell Biology*, v. 3, p. 22-33, 2008.

TÖPFER-PETERSEN, E.; WABERSKI, D. *Sperm maturation and fertilization*. In: BUSCH, W.; HOLZMANN, A. (Eds). *Veterinary Medicine Andrology, Physiology, Pathology of Reproduction in Male Animals*. Stuttgart: Schattauer. p. 69-72, 2001.

VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 47-53, 2007.

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

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

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

Tabela 1- Porcentuais (média \pm desvio padrão) de espermatozoides com membranas plasmática (iMP) e acrossoma (iAc) íntegros, e com alto potencial da membrana mitocondrial (aPMM) obtidos de reprodutores caprinos da raça Boer e criopreservados em diluente à base de leite desnatado e 7% de glicerol acrescido de Trolox

Grupos Experimentais	iMP (%)	iAc (%)	aPMM (%)
Controle	39,55 \pm 8,91	38,76 \pm 12,23	47,45 \pm 9,30
Trolox 30 μ M/mL	37,54 \pm 8,64	41,19 \pm 10,89	42,46 \pm 8,70
Trolox 60 μ M/mL	44,81 \pm 8,81	41,19 \pm 11,00	38,76 \pm 5,99
Trolox 120 μ M/mL	34,52 \pm 1,47	37,77 \pm 11,77	41,31 \pm 6,75

Tabela 2 - Parâmetros (média \pm desvio padrão) da cinética das células espermáticas de reprodutores caprinos da raça Boer, criopreservadas em diluente à base de leite desnatado e glicerol acrescido de Trolox

Grupos	MT	MP	LIN	STR	WOB	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF
Experimentais	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	($\mu\text{m/s}$)	($\mu\text{m/s}$)	($\mu\text{m/s}$)	($\mu\text{m/s}$)	(Hz)
Controle	77,22 \pm 18,56	26,26 \pm 12,21	47,28 \pm 6,30	74,00 \pm 1,46	63,70 \pm 8,11	76,05 \pm 7,26	35,98 \pm 5,83	48,50 \pm 7,66	3,23 \pm 0,40	12,05 \pm 1,44
Trolox 30 μM /mL	72,30 \pm 22,06	25,41 \pm 12,09	48,7 \pm 6,56	74,65 \pm 3,71	65,30 \pm 7,65	72,58 \pm 8,12	35,61 \pm 6,91	47,78 \pm 9,42	3,08 \pm 0,35	11,70 \pm 1,46
Trolox 60 μM /mL	76,73 \pm 15,82	26,28 \pm 8,73	49,41 \pm 5,10	73,45 \pm 2,48	68,33 \pm 6,40	71,51 \pm 7,71	35,71 \pm 4,44	48,65 \pm 6,27	2,96 \pm 0,37	10,56 \pm 1,41
Trolox 120 μM /mL	77,36 \pm 8,38	24,96 \pm 9,42	50,48 \pm 9,57	72,33 \pm 5,74	69,26 \pm 8,52	73,41 \pm 6,46	36,73 \pm 5,81	50,56 \pm 4,80	2,85 \pm 0,43	10,10 \pm 1,47

MT= Motilidade Total; MP= Motilidade Progressiva; LIN= Linearidade; STR= Retilinearidade; WOB= Oscilação; VCL= Velocidade Curvilínea; VSL= Velocidade progressiva; VAP=Velocidade média do trajeto.

Tabela 3 – Porcentual (média \pm desvio padrão) de estruturas íntegras de espermatozoides caprinos, obtidos de amostras de sêmen *in natura* e criopreservadas em leite desnatado e glicerol 7%, suplementado com Trolox, avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão

Grupos	iMca	iAc	iMC	AX	MIT
Experimentais					
<i>In Natura</i>	39,63+5,34 ^a	65,33+11,18 ^a	64,35+7,76 ^a	80,33+4,33 ^a	72,82+11,33 ^a
Controle	28,66+4,52 ^b	33,66+5,27 ^b	36,81+4,38 ^b	55,66+7,00 ^b	61,53+5,81 ^a
Trolox 30 μ M/mL	30,66+3,47 ^b	33,25+2,60 ^b	39,00+3,29 ^b	63,50+4,72 ^b	54,66+8,86 ^b
Trolox 60 μ M/mL	40,33+6,53 ^a	38,40+2,90 ^b	42,85+5,75 ^b	68,61+1,42 ^b	62,16+7,32 ^a
Trolox 120 μ M/mL	37,07+4,84 ^a	31,00+4,00 ^b	38,93+6,67 ^b	54,55+4,64 ^b	45,21+4,58 ^b

iMca= membrana plasmática íntegra na região da cabeça do espermatozóide; iAc= acrossoma íntegro; iMC= membrana plasmática íntegra na região da cauda do espermatozóide; AX= axonema íntegro; MIT= mitocôndrias íntegras. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

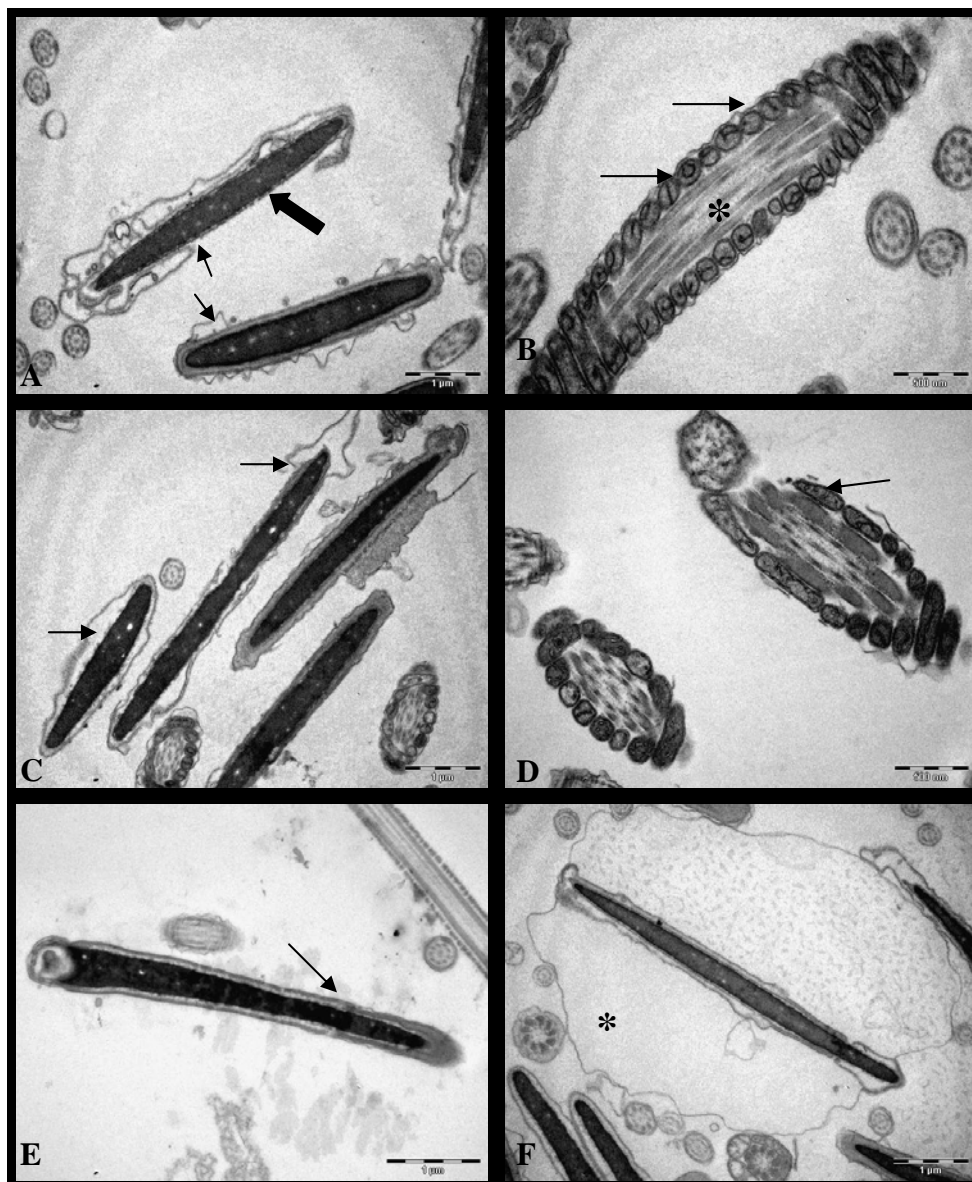


Figura 1 - Ultraestrutura de espermatozoides de reprodutores caprinos obtidos de sêmen *in natura* (A e B) e criopreservado (C, D, E e F) em diluente à base de leite desnatado e glicerol 7%. **A**: corte longitudinal da cabeça de espermatozoide apresentando membrana plasmática rompida (setas menores) e perda de material do acrossoma (seta maior); **B**: corte longitudinal da cauda de espermatozoide apresentando preservação do axonema (*) e mitocôndrias (setas); **C**: corte longitudinal da cabeça de espermatozoide criopreservado sem adição de antioxidantes (Controle) apresentando edema de membrana plasmática (setas); **D**: corte transversal da cauda de espermatozoide criopreservado com Trolox 30 $\mu\text{M}/\text{mL}$ apresentando desorganização das mitocôndrias (seta); **E**: corte longitudinal da cabeça de espermatozoide criopreservado com Trolox 60 $\mu\text{M}/\text{mL}$ apresentando integridade das membranas plasmática e acrossomal (seta); **F**: corte longitudinal da cabeça de espermatozoide criopreservado com Trolox 120 $\mu\text{M}/\text{mL}$ apresentando edema de membrana plasmática (*).

4.2 Avaliação *in vitro* de espermatozoides caprinos criopreservados em diluente à base de leite desnatado acrescido de Glutathione reduzida

In vitro evaluation of goat spermatozoa after freezing in skimmed-milk diluent supplemented with Glutathione reduced

Adriana Trindade Soares^{1,2}, Sildivane Valcácia Silva¹, Felipe Costa Almeida¹,
Paula Fernanda Barbosa de Araújo Lemos², José Ferreira Nunes³,
Christina Alves Peixoto⁴, Maria Madalena Pessoa Guerra¹

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

Autor para correspondência: mpguerra@dmv.ufrpe.br

²Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – EMEPA/PB;

³Laboratório de Tecnologia do Sêmen, UECE, Fortaleza, CE;

⁴Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) – Recife, PE.

RESUMO

Com o objetivo de avaliar *in vitro* o efeito da adição de Glutathione reduzida (GSH) ao diluente de congelação de sêmen à base de leite desnatado e glicerol 7%, na integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, cinética e ultraestrutura de espermatozoides criopreservados de caprinos, utilizou-se sêmen de cinco reprodutores da raça Boer. O sêmen foi colhido com vagina artificial, em seis repetições. Após avaliação de cada ejaculado, procedeu-se à formação do *pool* dos ejaculados e diluição (240×10^6 espermatozoides/mL) em leite desnatado e glicerol 7%, acrescido de antioxidantes de acordo com os grupos experimentais: G1) Controle; G2) GSH 2mM/mL; G3) GSH 5mM/mL e G4) GSH 7mM/mL. A seguir, as amostras de sêmen foram acondicionadas em palhetas (0,25mL), congeladas e armazenadas em botijão criobiológico. Após descongelação (37°C/30 segundos), alíquotas de sêmen de cada grupo foram avaliadas quanto a integridade de membrana plasmática (iMP) e acrossomal (iAc), potencial de membrana mitocondrial (PMM), cinética e ultraestrutura. A ultraestrutura foi avaliada em amostras de sêmen *in natura* e descongeladas. As análises de iMP, iAc, PMM e cinética dos espermatozoides não evidenciaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos Controle e GSH (2, 5 e 7mM/mL). Na análise ultraestrutural, observou-se que os percentuais de membrana plasmática (cabeça e cauda) e acrossoma íntegros não diferiram ($P > 0,05$) entre os grupos Controle e GSH (2, 5 e 7mM/mL), mas foram inferiores ($P < 0,05$) aos do sêmen *in natura*. Todavia, as amostras de sêmen *in natura* e do grupo Controle apresentaram maior percentual ($P < 0,05$) de gametas com axonema íntegros do que as dos grupos tratados com GSH (2, 5 e 7mM/mL). Maior porcentagem ($P < 0,05$) de espermatozoides com mitocôndrias íntegras foi observada nas amostras de sêmen do grupo Controle do que nos tratados com GSH (5 e 7mM/mL), e não diferiram das amostras do sêmen *in natura* e do GSH

2mM/mL. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a adição de GSH (2, 5 e 7mM/mL) em diluente de congelação de sêmen caprino, à base de leite desnatado e glicerol 7%, não preserva a integridade dos espermatozoides.

Palavras chave: antioxidantes, sêmen, viabilidade espermática.

ABSTRACT

Aiming to evaluate in vitro effect of different concentrations of Glutathione reduced (GSH) in skimmed-milk and glycerol 7% diluent on the plasma membrane (iPM) and acrosome (iAc) integrity, mitochondrial membrane potential (MMP), kinematic and ultrastructural analyses of thawed goat sperm, it were used semen samples from five Boer bucks. Semen samples were collected by artificial vagina, in six replicates. After analysis of each ejaculate, a pool of samples was diluted (240×10^6 sperm/mL) in skimmed-milk and glycerol 7% plus antioxidant, according to the experimental groups: G1) Control; G2) GSH 2mM/mL; G3) GSH 5mM/mL and G4) GSH 7mM/mL. After this, samples were packed in straws (0.25 mL), frozen and stored in Liquid Nitrogen (-196 °C). After thawing (37° C/30 seconds), semen aliquots of each group were subjected to integrity of the plasma membrane (iMP) and acrosomal (iAc), mitochondrial membrane potential (MMP), kinematic and ultrastructure analysis. The ultrastructure analyses were realized in in nature and thawed semen samples. The iMP, iAc, PMM and kinematic parameters showed no different difference ($P>0.05$) between Control and GSH (2, 5 and 7 mM/mL) groups. In ultrastructural analysis, it was observed that percentages of acrosome and plasma membrane (tail and head region) intact did not differ ($P>0.05$) between Control and GSH (2, 5 and 7 mM/mL) groups, but they were lower ($P<0.05$) than in nature semen. However, semen samples of in nature and Control groups had higher percentage ($P<0.05$) of gametes with intact axonemes than those of GSH (2, 5 and 7 mM/mL) groups. Higher percentage ($P<0.05$) of sperms with intact mitochondrias were observed on Control group than those of GSH (5 and 7 mM/mL) groups, but it did not differed of in nature semen and GSH 2mM/mL. According to the results, it can be concluded that the GSH (2, 5 and 7mM/mL) addition in skimmed-milk and glycerol 7% diluent to freezing goat semen did not preserve sperm integrity.

Keywords: antioxidants, semen, sperm viability.

1 INTRODUÇÃO

A redução da fertilidade, associada à inseminação artificial com sêmen congelado, vem sendo atribuída à ocorrência de danos espermáticos durante a congelação, onde cerca de 10-50% dos espermatozoides de um ejaculado não resistem e morrem. Os processos de congelação e descongelação causam alterações ultraestruturais, bioquímicas e funcionais que determinam redução da viabilidade da célula espermática. Durante a manipulação, os gametas são expostos ao oxigênio e várias etapas de seu processamento podem promover o aumento da produção de

espécies reativas ao oxigênio (ROS) (WATSON, 2000). Sabe-se, no entanto, que uma variedade de mecanismos de defesa denominados de antioxidantes estão envolvidos nos sistemas biológicos e que o equilíbrio entre os benefícios e danos de ROS e antioxidantes, *in vivo* e *in vitro*, parece ser necessário para o funcionamento reprodutivo normal (GUERRA et al., 2004).

Os antioxidantes presentes no plasma seminal normalmente ajudam a proteger os espermatozoides dos danos oxidativos, mas a retirada do plasma seminal pode ocasionar perda desta capacidade protetora, deixando os espermatozoides susceptíveis a lesões ocasionadas pela grande produção de ROS (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Visando reduzir danos oxidativos causados pela concentração elevada de ROS, algumas pesquisas têm adicionado substâncias antioxidantes em amostras de sêmen de pequenos ruminantes (MAXWELL e STOJANOV, 1996; SINHA et al., 1996).

A Glutathione (L-Y-Glutamyl-L-Cysteinylglycine) é um tripeptídeo distribuído nas células com importante papel nos mecanismos de defesa intracelular contra o estresse oxidativo. O núcleo do resíduo cisteinilglicina da Glutathione possui ação antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz de reagir com um elétron não pareado de um radical livre. Esta substância é hábil em inativar diretamente ROS como O_2^- e OH^- (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998), exercendo papel importante na detoxificação e antioxidação dos compostos endógenos, bem como na manutenção do *status* redox intracelular (LUBERDA, 2005).

A Glutathione está presente nas células em concentrações de 0,5 - 10mM, principalmente na forma reduzida (GSH). No espermatozoide, a Glutathione é encontrada em maiores concentrações na peça intermediária (KNAPEN et al., 1999). No entanto, o processo de criopreservação reduz significativamente a concentração desta substância antioxidante no sêmen de diversas espécies (GADEA et al., 2007). Neste sentido, objetivou-se com este trabalho avaliar *in vitro* o efeito da adição de Glutathione reduzida (GSH) ao diluente de congelação de sêmen caprino, à base de leite desnatado e glicerol 7%, na integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, cinética e ultraestrutura dos espermatozoides.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados no experimento foram obtidos da Sigma Aldrich Co.[®] (St. Louis, MO, USA).

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Boer, com fertilidade comprovada e idade variando de 24 a 36 meses. Os animais foram submetidos a regime intensivo, alimentados com 400g/dia de concentrado comercial, além de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado no cocho, sal mineral e água *ad libitum*. As colheitas de sêmen foram realizadas com auxílio de vagina artificial e presença de uma fêmea como manequim. Foram obtidos seis ejaculados de cada reprodutor, obedecendo a frequência de três colheitas de sêmen por semana, correspondendo a 30 amostras de sêmen.

Após colheita, as amostras de sêmen foram submetidas a avaliação, selecionando-se aqueles com motilidade $\geq 70,0\%$ e vigor ≥ 3 . Em seguida, procedeu-se à formação do *pool* de ejaculados, o qual foi centrifugado duas vezes (2500 g; 10 minutos) em tampão Tris (3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose, 100 mL de água bidestilada; pH 6,8), na proporção de 1:9 (v:v; sêmen:solução de lavagem).

A seguir, o *pool* dos ejaculados foi diluído em leite desnatado e glicerol (7%), na concentração de 240×10^6 espermatozoides/mL, acrescido de antioxidantes de acordo com o grupo experimental,: G1) Controle; G2) GSH 2 mM/mL; G3) GSH 5 mM/mL; e G4) GSH 7 mM/mL.

Após a diluição, as amostras foram acondicionadas em palhetas (0,25 mL) e submetidas a refrigeração e congelamento em sistema automatizado (modelo TK 3000[®] - TK Tecnologia em Congelamento LTDA, Uberaba, Brasil), na curva de congelamento rápida (- 0,25 °C/min, de 25 °C a 5 °C, e a - 20 °C/min, de 5 °C a -120 °C), e, após atingir a temperatura de -120 °C, as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Após descongelamento (37 °C, por 30 segundos), alíquotas de sêmen de cada grupo foram avaliadas quanto à integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial da membrana mitocondrial, cinética e ultraestrutura espermática. Para a integridade da membrana plasmática utilizou-se o método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e Iodeto de Propídio (IP), de acordo com Coletto et al. (2002). Alíquotas de 50 µL de sêmen foram diluídas em 150 µL de Tris contendo 5 µL de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 µL de IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos a 38 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), com aumento de 400 x usando filtro de emissão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485/20 nm, e classificados como membrana intacta quando se

apresentavam corados em verde ou como membrana danificada quando corados em vermelho.

A integridade do acrossoma foi avaliada corando-se os espermatozoides com isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA), de acordo com técnica descrita por Roth et al. (1998). Alíquotas de 5 μL de sêmen foram preparadas para esfregaço e secadas ao ar. Uma alíquota de 100 μL da solução estoque de FITC-PNA (1 mg/mL) foi descongelada e adicionada a 900 μL de PBS para obter a concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas (10 μL) desta solução foram colocadas sobre lâminas, as quais foram incubadas por 15 minutos em câmara úmida a 4 °C, na ausência de luz. Após incubação, as lâminas foram submetidas a duas lavagens em PBS refrigerado (4 °C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 μL de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de p-phenylenediamine) foi colocado sobre lâmina e coberto com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000 x, sob óleo de imersão, em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os gametas foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentaram a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou acrossoma reagido, quando apresentavam uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda região da cabeça.

A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE e WELCH, 2006). Alíquotas de 50 μL de sêmen foram diluídas em 150 μL de Tris, contendo 5 μL de JC-1 (0,15 mM em DMSO), incubadas por 10 minutos a 38 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), com aumento de 1000 x sob óleo de imersão usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

A análise da cinética espermática foi realizada por meio do sistema computadorizado (CASA; Sperm Class Analyzer, Microptics, S.L. Version 3.2.0 Barcelona, Spain). Alíquota de 5 μL da amostra de sêmen foi depositada na câmara de Mackler, mantida a 37 °C e examinada em microscópio de contraste de fase (100x) acoplado ao sistema Casa, onde se observou os parâmetros de motilidade total (MT, %),

motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), oscilação (WOB, %), amplitude de deslocamento da cabeça (ALH, μm), frequência do batimento de flagelo (BCF, Hz), segundo Verstegen et al. (2002).

A identificação de danos na ultraestrutura espermática foi realizada por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Amostras de sêmen *in natura* e congeladas/descongeladas foram centrifugadas três vezes (800 g; 5 minutos) em solução tampão (PBS) e fixadas *overnight* em solução contendo Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 2,5% e tampão Cacodilato de Sódio 0,1M. Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas numa solução contendo 1% de Tetróxido de ósmio, 2 mM CaCl_2 e 0,8% de Ferricianeto de Potássio em tampão Cacodilato 0,1 M, pH 7,2. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas em tampão Cacodilato e submetidas a contrastação em bloco com Acetato de Uranila 2,5%.

A seguir, as amostras de sêmen foram desidratadas em séries crescentes de acetona, infiltradas e emblocadas em resina SPIN-PON. A polimerização foi realizada a 60 °C por 72 horas. Cortes ultrafinos foram coletados em grades de níquel de 300-mesh e contrastados com 5% de Acetato de Uranila e Citrato de Chumbo (Sigma, Saint Louis, MO, USA), segundo as recomendações de Saraiva et al. (2009). As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgani 268D (FEI Company, Eindhoven, Netherlands).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o procedimento PROC CORR do programa SAS (2001). Os dados das variáveis estudadas foram submetidos à análise de variância, obedecendo a um delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se o teste F para comparação dos quadrados médios dos fatores testados e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS

Os resultados da avaliação do sêmen caprino submetido a congelamento utilizando leite desnatado e glicerol 7% não demonstrou diferença significativa ($P>0,05$) na porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras, assim como com alto potencial da membrana mitocondrial (Tabela 1) entre as amostras do grupo Controle e dos grupos tratados com GSH (2, 5 e 7mM/mL).

A análise da cinética espermática (Tabela 2) também não evidenciou diferença significativa ($P>0,05$) entre as amostras do grupo Controle e suplementadas com diferentes concentrações de GSH (2, 5 e 7mM/mL).

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da integridade das ultraestruturas celulares, avaliadas pela MET, onde se observa que os percentuais de danos na membrana plasmática da região da cabeça e cauda, e do acrossoma não diferiram ($P>0,05$) entre grupos (Controle e GSH 2, 5 e 7mM/mL), mas foram inferiores ($P<0,05$) aos do sêmen *in natura*. Todavia, as amostras de sêmen *in natura* e do grupo Controle apresentaram maior percentual ($P<0,05$) de gametas com axonema íntegros do que as dos grupos tratados com GSH (2, 5 e 7mM/mL). Menor percentual ($P<0,05$) de espermatozoides com axonemas intactos foi observado nas amostras dos grupos GSH 7mM/mL do que nos demais grupos.

As amostras do grupo Controle apresentaram maior porcentagem ($P<0,05$) de espermatozoides com mitocôndrias íntegras do que nos grupos tratados com GSH (5 e 7mM/mL), mas não diferiram das amostras do sêmen *in natura* e do grupo GSH 2mM/mL. Menor porcentagem ($P<0,05$) de gametas com mitocôndrias íntegras foi observado nas amostras dos grupos Controle e GSH 2mM/mL.

Na análise qualitativa da ultraestrutura dos espermatozoides caprinos foram observados nos espermatozoides das amostras *in natura*, preservação do acrossoma e da membrana plasmática (Figura 1A) em grande quantidade de gametas. No entanto, também foram observadas células com rompimento e ondulação da membrana plasmática na região da cabeça (Figura 1B). Nas amostras de sêmen criopreservadas, foram evidenciadas células com perda de material acrossomal; edema, ondulação e rompimento da membrana plasmática na cabeça (Figuras 1C, 1D) e cauda (Figura 1D); desorganização do axonema e das mitocôndrias (Figura 1F).

4 DISCUSSÃO

Apesar de espermatozoides caprinos submetidos à congelação utilizando diluente à base de leite desnatado e glicerol 7%, analisados com sondas fluorescentes, não terem evidenciado diferença significativa entre os grupos Controle e tratados com GSH (2, 5 e 7 mM), constatou-se percentual numericamente maior de espermatozoides com membrana plasmática íntegra nas amostras congeladas com GSH 2mM/mL. Além

disso, observou-se que, ao aumentar a concentração deste antioxidante, os percentuais de gametas com membrana plasmática intacta foram numericamente menores. Estes resultados sugerem a necessidade de realização de mais estudos utilizando concentração de GSH menor do que 2 mM/mL, uma vez que segundo Bilodeau et al. (2001), a adição de glutathione ao diluidor de criopreservação varia de 0,1 a 2 mM, e que concentrações mais elevadas causam danos aos espermatozoides bovino, por alterar a osmolaridade celular, fragilizando a membrana plasmática e determinando ruptura nas membranas da célula espermática.

Todavia, na análise do acrossoma espermático, apesar de não haver sido constatada diferença significativa entre os grupos Controle e tratados com GSH (2, 5 e 7 mM), foi verificado que as concentrações mais elevadas de GSH foram benéficas à integridade desta estrutura celular. Sabe-se que a GSH atua removendo o H_2O_2 , um inibidor extremamente eficaz da tirosina fosfatase (enzima envolvida na fosforilação da tirosina), conforme observado por Hecht e Zick (1992), e impede o início da capacitação dos espermatozoides (AITKEN et al., 1995). Desta forma, acredita-se que neste estudo deveria ter sido utilizada concentração de GSH maior do que 7mM/mL. Todavia, a análise da membrana plasmática demonstrou exatamente o inverso, deixando dúvida quanto a melhor concentração de GSH a ser utilizada em diluidor de congelação de sêmen caprino, uma vez que os dois parâmetros se referem à integridade de membranas que participam do processo de capacitação espermática.

Uma vez que a glutathione intracelular é encontrada em maiores concentrações na peça intermediária (KNAPEN et al., 1999), esperava-se que a região da cabeça do espermatozoide (membranas plasmática e acrossomal) necessitasse de maior concentração deste antioxidante exógeno para se proteger dos danos ocorridos durante a criopreservação. No entanto, no presente estudo, esta afirmação foi confirmada apenas na integridade de acrossoma. Além disso, os resultados deste estudo contradizem os relatos de Sinha et al. (1996), que, ao utilizarem GSH (2 e 5mM) em amostras de espermatozoides criopreservados de caprinos, em meio à base de Tris e glicerol, observaram aumento significativo da motilidade, integridade de acrossoma e taxas de concepção ao utilizarem 5mM de GSH, sugerindo que, nesta concentração, este antioxidante protege as membranas dos espermatozoides de danos da peroxidação lipídica.

Neste estudo, observou-se também que as concentrações de 2, 5 e 7 mM/mL de Glutathione não preservaram o potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides

caprinos criopreservados. Todavia, a concentração de 2mM/mL determinou porcentual igual àquele observado nas amostras de sêmen do grupo Controle e numericamente menores do que ao se utilizar 5 e 7mM/mL, reforçando a necessidade de mais estudos utilizando menores concentrações deste antioxidante ao diluidor de congelação do sêmen caprino. No entanto, esperava-se que, pelo fato da região da cauda do espermatozoide ser mais resistente a danos do que o acrossoma e a membrana plasmática que envolve a cabeça do espermatozoide (SALAMON e MAXWELL, 1995), e que algumas enzimas antioxidantes encontram-se em maior concentração na peça intermediária (KNAPEN et al., 1999), a adição de GSH determinasse maior proteção das membranas (plasmática e acrossomal) localizadas na cabeça do espermatozoide.

O resultado da análise com sondas fluorescentes deste estudo mostrou que as membranas (plasmática e acrossomal) e o potencial de membrana mitocondrial foram susceptíveis aos danos causados pela congelação ao espermatozoide caprino. Todavia, contradiz os relatos de Azevedo (2006), ao demonstrar que a criopreservação reduziu o potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides de ovinos, mas que a membrana plasmática e a membrana acrossomal foram mais vulneráveis do que outras partes do espermatozoide envolvidas na locomoção.

O valor porcentual médio do potencial da membrana mitocondrial (PMM) obtido no presente estudo ($47,45 \pm 9,30\%$) foi semelhante aos 40,33% relatados por Batista et al. (2009), estudando a viabilidade espermática de espermatozoides caprinos da raça Boer criopreservados sob o mesmo protocolo do presente estudo. Marco-Jiménez et al. (2006) constataram que o processo de congelação/descongelação de espermatozoides caprinos da raça Murciano-granadina determinou considerável redução do número de células com alto PMM (59,00% vs 27,70%), avaliados pelo JC-1. No entanto, o porcentual de gametas com alto PMM observado por estes autores foi inferior àquele observado neste estudo com sêmen caprino da raça Boer. Estes resultados sugerem existir variação no resultado de PMM dos espermatozoides criopreservados de acordo com a raça, diluente ou método de congelação utilizados.

A análise da cinética espermática não evidenciou diferença na motilidade total e progressiva entre o grupo Controle e os tratados com GSH (2, 5 e 7 mM). Todavia, observou-se que mais de 60% dos gametas apresentavam-se vivos, enquanto menos de 30% destes apresentavam motilidade progressiva. Os baixos percentuais de motilidade total observado nas amostras de sêmen pós-descongelação ratificam os

efeitos da criopreservação sobre a célula espermática, constatada por Leboeuf et al. (2000) e Watson (2000). Segundo estes autores, cerca de 10 a 50% da população total dos espermatozoides não sobrevivem ao processo de congelamento e morrem, conforme aconteceu no presente trabalho. O baixo percentual de espermatozoides com motilidade progressiva pode ser atribuído ao processo de congelamento, que causa danos subletais que reduzem a qualidade do movimento espermático (PESCH e BERGMANN, 2006), provavelmente devido à exposição espermática ao oxigênio e, conseqüentemente, aumento da produção de ROS (WATSON, 2000). Este fato evidencia que a adição de GSH, nas concentrações utilizadas, não foi adequada para inativar diretamente as ROS como O_2^- e OH^- (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998), determinando manutenção do *status* redox intracelular (LUBERDA, 2005). O resultado da motilidade total e progressiva avaliada pelo CASA evidencia que, ao se aumentar a concentração de GSH, reduz-se os percentuais de gametas vivos e com movimento progressivo, ratificando o resultado da análise de integridade da membrana plasmática, realizada por sonda fluorescente.

Ao analisar os parâmetros de MP, LIN, STR, WOB, VSL e VAP (Tabela 2), pode-se observar que a adição de GSH na concentração de 5mM/mL determinou resultados numericamente menores do que aqueles com 2 e 7mM/mL de GSH. Ressalta-se que o mesmo grupo experimental (GSH 5mM/mL) apresentou os menores percentuais de espermatozoides com alto PMM (Tabela 1), evidenciando relação entre estes parâmetros da cinética espermática e da análise do PMM.

No presente estudo foi hipotetizado que a adição de Glutathione reduzida ao meio de congelamento pudesse proteger a célula espermática durante a criopreservação. No entanto, foi observado que a adição deste antioxidante, nas concentrações utilizadas, não melhorou significativamente, a qualidade dos espermatozoides pós-descongelamento. Este resultado pode ser atribuído à presença da caseína presente no diluente à base de leite utilizado neste estudo, conforme foi ressaltado por Foote et al. (2002). Segundo estes autores, a adição dos antioxidantes glutathione, superóxido dismutase, ácido ascórbico, hipotaurina, tempo e tempol ao diluente à base de leite e glicerol, não exercem efeito benéfico na motilidade ou na fertilidade do sêmen bovino, devido à presença da caseína, antioxidante natural encontrado em grande quantidade no leite. Todavia, em virtude das diferenças na composição das membranas plasmáticas de espermatozoides das espécies caprina e bovina (PURDY, 2006), a adição de GSH ao diluente de congelamento do sêmen caprino poderia preservar a integridade de suas membranas.

Ressalta-se, também, que a congelação das amostras de sêmen caprino não causou hiperativação das células espermáticas das amostras dos grupos Controle e tratados com GSH (2, 5 e 7 mM/mL), uma vez que, segundo classificação de Mortimer e Maxwell (1999), não apresentam valores de $VCL > 250,0 \mu\text{m/s}$, $VSL \leq 100,0 \mu\text{m/1}$, $LIN \leq 30\%$ e $ALH_{\text{max}} \geq 9,0 \mu\text{m/s}$. No entanto, com base nos resultados das avaliações por sondas fluorescentes, esperava-se que estes gametas apresentassem sinais de hiperativação (WATSON, 1995), devido à ocorrência de danos na membrana plasmática determinados pela congelação (CHECK e CHECK, 1991), que podem resultar na antecipação da maturação das membranas espermáticas e aumento da proporção de espermatozoides capacitados ou com acrossomo reagido, quando comparados aos do sêmen *in natura* (MAXWELL e WATSON, 1996).

A perda da motilidade progressiva observada nos espermatozoides de caprinos submetidos à congelação utilizando diluente à base de leite desnatado e glicerol 7%, sem adição de antioxidantes (grupo Controle) ou suplementado com GSH pode ser justificada pela constatação de danos ultraestruturais ocorridos nas membranas plasmática e acrossomal e nas mitocôndrias destes gametas. Segundo Leboeuf et al. (2000), alterações nestas estruturas determinam redução da motilidade e da viabilidade espermática, com conseqüente redução da fertilidade.

Conforme o esperado, observou-se na análise ultraestrutural que as amostras de sêmen *in natura* apresentaram maior quantidade de gametas com membrana plasmática, acrossoma e mitocôndrias íntegras, visto que o mesmo não foi submetido a nenhum estresse térmico, químico ou de manipulação. Entretanto, sabe-se que um ejaculado é composto de várias sub-populações, podendo apresentar espermatozoides de diferentes épocas de maturação, já que a gametogênese masculina é ininterrupta (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Desta forma, foi possível observar a presença de alterações na estrutura destas células, como edema e rompimento da membrana plasmática e reação acrossomal, porém em menor proporção do que as observadas nos grupos submetidos à criopreservação (Controle e GSH).

O processo de criopreservação determinou lesões severas na membrana plasmática dos espermatozoides na região da cabeça e cauda, caracterizadas por edemas, ondulações e rupturas, conforme descritas em espermatozoides de cães (STRÖM HOLST et al., 1998; BURGESS et al., 2001) e de caprinos (HASHIDA et al., 2005). Todavia, a ocorrência destes danos difere entre as espécies, em virtude dos espermatozoides possuírem tamanhos, formas e composição lipídica diferentes

(PURDY, 2006). Neste estudo, observou-se que a adição de GSH, nas concentrações de 2, 5 e 7 mM/mL não determinou diferença significativa na integridade da membrana plasmática na região da cabeça e da cauda dos espermatozoides, assim como no acrossoma. Todavia, constatou-se percentual numericamente maior de gametas com membrana plasmática íntegra na região da cabeça espermática no grupo 2 mM/mL de GSH, em relação do grupo Controle, sugerindo a realização de estudos utilizando concentrações menores do que 2mM/mL de GSH. Da mesma forma, apesar de não se observar percentuais numericamente maiores de espermatozoides com membrana plasmática na região da cauda, axonema e mitocôndrias íntegras nas amostras suplementadas com GSH 2mM/mL, em relação às amostras do grupo Controle, constata-se que a utilização de menores concentrações deste antioxidante pode aumentar os percentuais destas estruturas íntegras.

Ressalta-se, ainda, que as análises por sondas fluorescentes e por MET apresentaram resultados semelhantes, ao evidenciarem que, apesar de não diferirem estatisticamente, os percentuais de espermatozoides com membrana plasmática íntegra na região da cabeça foram numericamente maiores nas amostras do grupo GSH 2mM/mL do que nas do grupo Controle. Além disso, observou-se coerência nos resultados de acrossomas íntegros avaliados por estas duas técnicas (FITC-PNA e MET).

A realização deste estudo ratifica a necessidade de mais estudos adicionando concentrações de GSH menores do que 2mM/mL ao diluente de congelação do sêmen caprino, em virtude de que, nesta espécie, geralmente se retira o plasma seminal, local de maior concentração de enzimas antioxidantes, deixando os espermatozoides susceptíveis a lesões causadas por estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Desta forma, a necessidade da suplementação exógena desta e de outras enzimas pode compensar esta perda, apesar de muitas vezes as quantidades adicionadas aos diluentes não serem suficientes para suprir a necessidade da célula, resultando em danos celulares (BILODEAU et al., 2000).

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a adição de GSH (2, 5 e 7mM/mL) em diluente à base de leite desnatado e glicerol 7% para congelação do sêmen caprino não preserva a integridade dos espermatozoides.

6 AGRADECIMENTOS

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

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J.; PATERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D.W.; VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Science*, v. 108, p. 2017-2025, 1995.

AZEVEDO, H.C. *Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico-linoleico e à lactoalbumina*. 2006, 195p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; WISCHRAL, A.; GUERRA, M.M.P. Efeito dos métodos *Swim-up* e Percoll sobre a viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, p. 409, 2009

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

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v. 56, n. 2, p. 275-286, 2001.

BURGESS, C.M.; BREDL, J.C.S.; PLUMMER, J.M. et al. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 57, p. 357-363, 2001.

- CHECK, M.L.; CHECK, J.H. Poor hypo-osmotic swelling test results from cryopreserved sperm despite preservation of sperm motility. *Archives of Andrology*, v. 26, p. 37-41, 1991.
- COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 24, p.101-104, 2002.
- 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.
- GADEA, J.; GUMBAO, D.; CÁNOVAS, S.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.A.; GRULLÓN, L.A.; GARDÓN, C. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *International Journal of Andrology*, p. 31, p. 40-49, 2007.
- GARDÓN, J.C.; RODRIGUES, J.A.; GADEA, J. Addition of reduced glutathione to thawing medium improved the sperm motility and reduced ROS generation in frozen ovine and caprine spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 18, p. 155, 2003.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.E.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de literatura). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 28, p. 187-195, 2004.
- GUTHRIE, H.D.; WELCH G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*, v. 84, p. 2089-2100, 2006.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7ª Ed, São Paulo: Editora Manole, 2004. 513p.
- HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H.; MAT NORR, M. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrossome-reacted goat sperm. *Biomedical Research*, v.16, p.119-123, 2005.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ed., New York: Oxford University Press, 1999. 936p.
- HECHT, D.; ZICK, Y. Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, V.188, P.773-779, 1992.

- JORDÃO JÚNIOR, A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: Papel da Glutathiona reduzida e da Vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 31, p. 434-449, 1998.
- KNAPEN, M.F.C.M.; ZUSTERZEEL, P.L.M.; PETERS, W.H.M.; STEEGERS, E.A.P. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 82, p. 171-184, 1999.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 113-141, 2000.
- LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Biology Reproductive*, v. 5, p. 5-17, 2005.
- MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; BALASCH, S.; MOCÉ, E.; SILVESTRE, M.A.; GOMEZ, E.A.; VICENTE, J.S. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*, v. 52, p. 295-304, 2006.
- MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 8, p. 1013-20, 1996.
- MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 55-65, 1996.
- MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 11, p. 25-30, 1999.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, v. 37, p. 597-612, 2006.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v. 63, p. 215-225, 2006.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, J.L.; BUSH, L.M.L; WILDT, D.E.; BUSH, M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). *Biology of Reproduction*, v.58, p.475-482, 1998.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen insemination processing freezig, thawing ad fertility after cervical insemination (review). *Animal Reproduction Science*, v. 37, p. 185-249, 1995.

- SARAIVA, K.L.A.; SILVA, A.K.S.E.; WANDERLEY, M.I. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 90, p. 454–462, 2009.
- SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SING, B.K.; PRASAD, R.L. The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science*, v. 41, p. 237-43, 1996.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. *SAS/STAT: user's guide*, Version 6, 4.ed., v.2, Cary: SAS Institute, 2001. (CD-ROM).
- STRÖM HOLST, B.; ROTA, A.; ANDERSEN BERG, K.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation content of selected elements. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 33, p. 77-82, 1998.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment 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.

Tabela 1- Porcentuais (média \pm desvio padrão) de espermatozoides com membranas plasmática (iMP) e acrossoma (iAc) íntegros, e com alto potencial da membrana mitocondrial (aPMM) obtidos de reprodutores caprinos da raça Boer e criopreservados em diluente à base de leite desnatado e 7% de glicerol acrescido de Glutathiona reduzida (GSH)

Grupos Experimentais	iMP (%)	iAc (%)	PMM (%)
Controle	39,55 \pm 8,91	38,76 \pm 12,23	47,45 \pm 9,30
GSH 2 mM/mL	43,31 \pm 9,91	35,05 \pm 11,90	47,51 \pm 9,04
GSH 5 mM/mL	39,14 \pm 9,80	38,08 \pm 12,95	38,41 \pm 9,48
GSH 7 mM/mL	36,09 \pm 7,66	46,21 \pm 10,71	40,21 \pm 3,61

Tabela 2 - Parâmetros (média \pm desvio padrão) da cinética das células espermáticas de reprodutores caprinos da raça Boer, criopreservadas em diluente a base de leite desnatado e glicerol acrescido de Glutathiona reduzida (GSH)

Grupos Experimentais	MT (%)	MP (%)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH ($\mu\text{m/s}$)	BCF (Hz)
Controle	77,22 \pm 18,56	26,26 \pm 12,21	47,28 \pm 6,30	74,00 \pm 1,46	63,70 \pm 8,11	76,05 \pm 7,26	35,98 \pm 5,83	48,50 \pm 7,66	3,23 \pm 0,40	12,05 \pm 1,44
GSH 2 mM/mL	84,98 \pm 10,16	27,46 \pm 8,06	48,53 \pm 6,32	73,76 \pm 4,42	65,75 \pm 6,95	75,93 \pm 8,76	37,06 \pm 7,55	50,25 \pm 9,90	3,13 \pm 0,33	11,38 \pm 1,74
GSH 5 mM/mL	73,11 \pm 21,32	19,00 \pm 10,33	42,86 \pm 6,55	64,61 \pm 17,65	60,01 \pm 6,95	74,03 \pm 9,54	31,76 \pm 6,45	42,73 \pm 11,09	3,43 \pm 0,64	11,90 \pm 1,40
GSH 7 mM/mL	64,13 \pm 20,36	21,15 \pm 10,32	48,40 \pm 5,73	74,78 \pm 1,13	64,61 \pm 7,59	71,73 \pm 7,14	34,70 \pm 5,45	46,40 \pm 7,32	3,25 \pm 0,55	11,90 \pm 1,27

MT= Motilidade Total; MP= Motilidade Progressiva; LIN= Linearidade; STR= Retilinearidade; WOB= Oscilação; VCL= Velocidade Curvilínea; VSL= Velocidade progressiva; VAP= Velocidade de Trajeto; ALH= Amplitude de Deslocamento da Cabeça; BCF= Frequência do Batimento de Flagelo.

Tabela 3 – Porcentual (média \pm desvio padrão) de estruturas íntegras de espermatozoides caprinos, obtidos de amostras de sêmen *in natura* e criopreservadas em leite desnatado e glicerol, suplementado com Glutathiona reduzida (GSH), avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão

Grupos	iMca	iAc	iMC	AX	MIT
<i>In Natura</i>	39,63 \pm 5,34 ^a	65,33 \pm 11,18 ^a	64,35 \pm 7,76 ^a	80,33 \pm 4,33 ^a	72,82 \pm 11,33 ^a
Controle	28,28 \pm 4,52 ^b	33,66 \pm 5,27 ^b	36,31 \pm 4,38 ^b	55,66 \pm 7,00 ^b	61,53 \pm 5,81 ^{ab}
GSH 2mM/mL	35,25 \pm 5,34 ^b	27,40 \pm 3,20 ^b	30,75 \pm 2,52 ^b	43,90 \pm 5,94 ^c	50,86 \pm 3,94 ^b
GSH 5mM/mL	26,51 \pm 2,50 ^b	30,11 \pm 1,64 ^b	30,31 \pm 2,98 ^b	44,18 \pm 5,79 ^c	30,58 \pm 1,49 ^c
GSH 7mM/mL	26,13 \pm 3,38 ^b	31,38 \pm 2,35 ^b	29,58 \pm 2,56 ^b	33,96 \pm 4,34 ^d	28,43 \pm 2,19 ^c

iMca= membrana plasmática íntegra na região da cabeça do espermatozóide; iAc= acrossoma íntegro; iMC= membrana plasmática íntegra na região da cauda do espermatozóide; AX= axonema íntegro; MIT= mitocôndrias íntegras. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P<0,05)

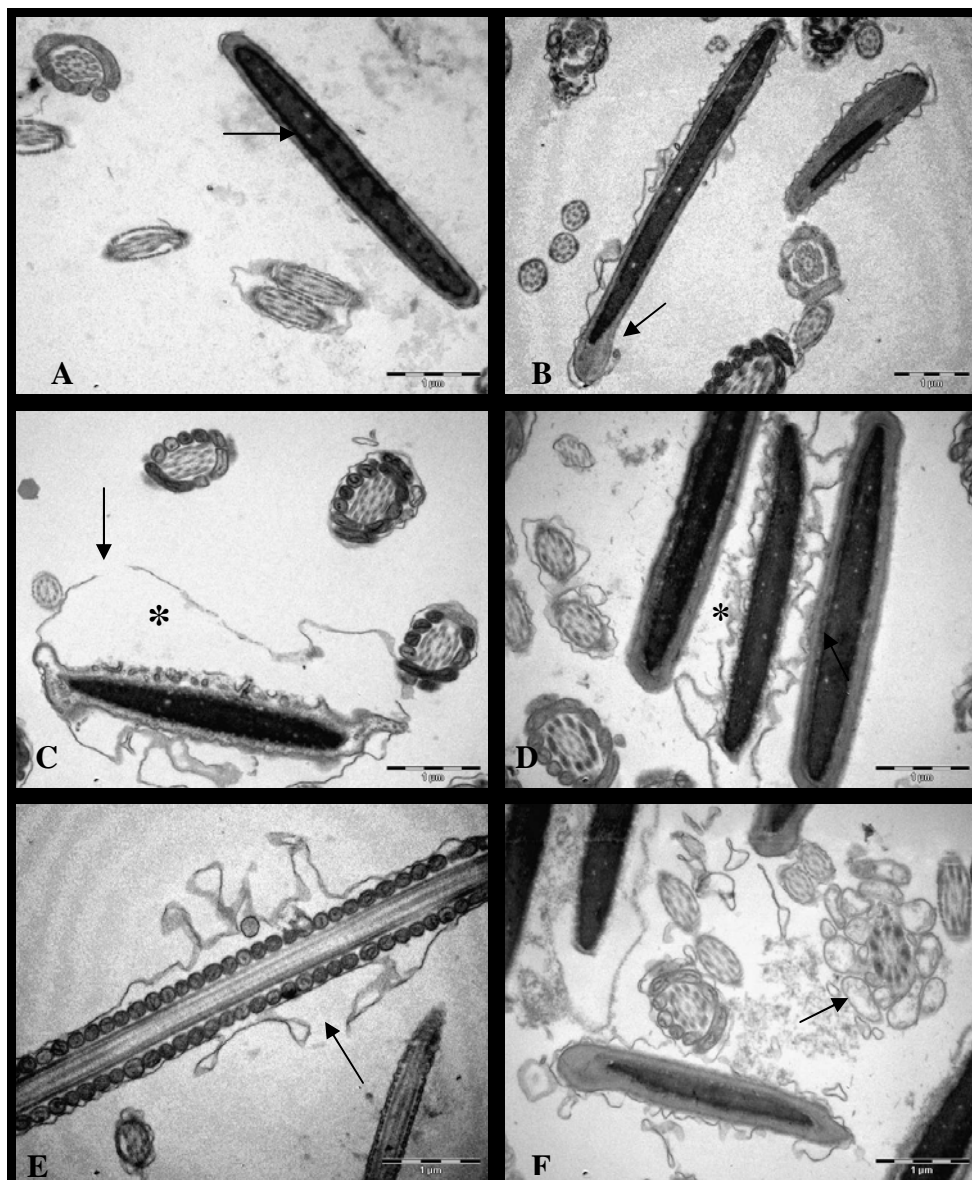


Figura 1 - Ultraestrutura de espermatozoides de reprodutores caprinos obtidos de sêmen *in natura* (A e B) e criopreservado (C, D, E e F) em diluente à base de leite desnatado e 7% de glicerol. **A:** corte longitudinal da cabeça de espermatozoide apresentando membranas plasmática e acrossomal íntegras (seta); **B:** corte longitudinal da cabeça de espermatozoide apresentando membrana plasmática rompida (seta); **C:** corte longitudinal da cabeça de espermatozoides criopreservado sem adição de antioxidantes (controle) apresentando rompimento (seta) e edema (*) da membrana plasmática; **D:** corte longitudinal da cabeça de espermatozóide criopreservado com diluente acrescido de GSH 2mM/mL apresentando ondulação da membrana plasmática (*); **E:** corte longitudinal da peça intermediária de espermatozoide criopreservado com diluente acrescido de GSH 5mM/mL apresentando rompimento da membrana plasmática (seta); **F:** corte transversal da peça intermediária de espermatozóide criopreservado com diluente acrescido de GSH 7mM/mL apresentando destruição das mitocôndrias (seta).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do efeito da congelação, sobre a viabilidade do espermatozoide caprino, utilizando diluente à base de leite desnatado e glicerol, suplementado com os antioxidantes Trolox e Glutathione reduzida, nas concentrações utilizadas, por meio da avaliação das estruturas espermáticas usando sondas fluorescentes e/ou microscopia eletrônica de transmissão, bem como por meio da avaliação da cinética espermática avaliada pelo CASA, constitui um grande avanço na busca pelo conhecimento da fisiopatologia dos gametas masculinos.

Desta forma, em virtude dos efeitos observados nas membranas plasmática e acrossomal, é possível afirmar que:

- O uso do Trolox (60 μ M/mL) e Glutathione reduzida, em concentrações inferiores, devem testados em futuras pesquisas com o objetivo de confirmar seus efeitos sobre a viabilidade da célula espermática criopreservada, associado à avaliação das taxas de fertilização *in vivo* em programas de inseminação artificial;
- A utilização das sondas Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e Iodeto de Propídio (IP), FICT-PNA e JC-1 permitiram avaliar a integridade das membranas plasmática, acrossomal e o potencial da membrana mitocondrial, respectivamente, da célula espermática e, com o auxílio da MET, foi possível identificar a origem dos danos que sofreram a célula espermática criopreservada;
- A utilização da computer Assisted Sêmen Analyses – CASA permitiu analisar as características do movimento da célula espermática de caprinos contribuindo para o melhor entendimento do comportamento do espermatozoide submetido à criopreservação;
- A análise ultraestrutural (MET) demonstrou que a ocorrência de danos na célula espermática foi menos evidente nos grupos suplementados com Trolox, sugerindo a adição deste antioxidante em diluentes à base de leite desnatado para congelação do sêmen de caprinos, já eficaz em manter a integridade das membranas plasmática e acrossomal, e das mitocôndrias. Além disso, sugere o estudo de outras concentrações do Trolox visando identificar outros aspectos positivos da adição deste antioxidante;
- Os parâmetros avaliados podem identificar os animais portadores de deficiência reprodutiva e direcionar a seleção de reprodutores capacitados a serem utilizados em programas de melhoramento genético auxiliados pela reprodução assistida.