

ELLEN CORDEIRO BENTO DA SILVA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES E
ANTIOXIDANTES NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE
OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS**

RECIFE

2010

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

ELLEN CORDEIRO BENTO DA SILVA

EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES E
ANTIOXIDANTES NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE
OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

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

RECIFE - PE

2010

Ficha catalográfica

S586e Silva, Ellen Cordeiro Bento da
Efeito da adição de diferentes crioprotetores e antioxidantes
na criopreservação do sêmen de ovinos da raça Santa Inês /
Ellen Cordeiro Bento da Silva – 2010.
95 f. : il.

Orientador: Maria Madalena Pessoa Guerra
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.
Referência

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

CDD 636.08926

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

**EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES E
ANTIOXIDANTES NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN DE
OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS**

Dissertação de Mestrado elaborada e defendida por

ELLEN CORDEIRO BENTO DA SILVA

Aprovada em 26 de Fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña-Alfaro/UFCG

Prof. Dr. Gustavo Férrer Carneiro/UFRPE

Dr.^a Zoraide Fernandes Coletto

A Deus, minha família e, em particular, minha mãe Vera, meus amigos e minha professora Madalena, por terem acreditado e confiado em mim mesmo nas horas em que nem eu mesma acreditei.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos concedidas ao longo de minha vida, pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho e por ter, em todos os momentos, me conduzido com suas mãos de Pai por caminhos retos e tranquilos, não me deixando vacilar, por nenhum instante, mesmo nas mais duras provas;

A toda minha família, anjos de Deus colocados em minha vida para me apoiar, guardar e proteger;

A minha avó, Maria Guilhermina Cordeiro de Oliveira, que apesar de não mais estar fisicamente ao meu lado, foi de fundamental importância para a minha formação como pessoa e como profissional, sendo para mim um exemplo de caráter e de coragem;

A minha mãe, Vera Lúcia Cordeiro Bento da Silva, alicerce de nossa família, exemplo de mulher e de guerreira que sempre esteve ao meu lado nas horas mais tristes e mais felizes da minha vida, chorando e rindo junto a mim, lutando pela minha vida e pelos meus estudos;

A meu pai, José Bento da Silva, sempre disciplinado nos estudos e no trabalho me ensinou a dar o melhor de mim, a fazer o máximo e da melhor forma que pudesse;

Aos meus amados irmãos, Vlademir Cordeiro Bento da Silva e Patrícia Cordeiro Bento da Silva, que sempre estiveram ao meu lado como cúmplices e amigos verdadeiros;

A todos os meus inúmeros tios e primos, pela família abençoada que ajudam a formar;

Ao Professor Fabrício Bezerra de Sá, pela orientação, amizade, apoio e carinho que jamais esquecerei;

À minha eterna professora e orientadora, Maria Madalena Pessoa Guerra, a qual tenho como uma mão querida, exemplo de profissional e de ser humano que a todos trata com respeito, carinho, dedicação e amizade;

Aos técnicos e funcionários Alcir, Joana, D^a Sonia e Marquinhos, pelo carinho e atenção;

Aos antigos e atuais companheiros de laboratório, Adriana, Álvaro, André, Clara, Diogo, Felipe Costa, Fernanda, Filipe Soares, Gustavo Takeda, Jobson, Kaline, Lawrence, Lígia, Lorena, Mariana, Patrícia, Pedro Leopoldo, Prof.^a Érika, Sildivane, Victor e Zoraide, amigos queridos a quem devo muito do que consegui e aos quais agradeço pela amizade, carinho, dedicação, atenção e incentivo;

Ao farmacêutico Járisson, pela sua simplicidade, acessibilidade, atenção e amizade, colaborando para a realização deste trabalho de pesquisa pelo fornecimento dos antioxidantes, juntamente a farmácia de manipulação “A Fórmula”, mas especialmente seu incentivo e amizade;

A todas as pessoas da Fazendinha, D^a Severina, Sr. Edierre, Rafinha, Silvinha, Edierrizinho, Edinho, Orlando, Tartaruga, Val e Sr. Severino, nomes que ficaram marcados não apenas em minha mente, mas principalmente em meu coração pelo acolhimento e amor a mim destinados;

A FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), pela concessão de bolsa de mestrado e suporte financeiro;

A Deus, novamente agradeço, pelo seu amor de Pai e pela proteção destes anjos abençoados colocadas em minha vida para me guardarem de todo mal.

“Meu filho, aceita a instrução desde teus jovens anos;
Ganharás uma sabedoria que durará até a velhice.
Vai ao encontro dela, como aquele que lava e semeia;
Espera pacientemente seus excelentes frutos;
Terás alguma pena em cultivá-la, mas em breve comerás
os seus frutos.”

(Eclesiástico 6, 18-20)

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: Porcentual

ADP: Adenosina difosfato

AQP7: Aquaporinas 7

ATP: Adenosina trifosfato

BODIPY: Boron dipyrromethene difluoride

Ca²⁺: Íon cálcio

CAT: Catalase

ClO⁻: Hipoclorito

CTC: Clortetraciclina

Cu²⁺: Íon cobre

DCF: Diacetato de carboxifluoresceína

DMSO: Dimetil sulfoxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNAmt: Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

Fe²⁺: Íon ferro

Fe³⁺: Íon ferro

FITC-PNA: Fluorescein isothiocyanate-conjugated agglutinin

GSH: Glutathione reduzida

GSH-Px: Glutathione peroxidase

GSH-Red: Glutathione reductase

GSSG: Glutathione oxidada

H⁺: Cátion hidrogênio

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

IA: Inseminação artificial

iAC: Integridade do acrossoma

iMP: Integridade de membrana plasmática

IP: Iodeto de propídeo

JC-1: 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianine iodide

L: Litro

Kg: Quilograma

M: Molar

MDA: Malonaldeído

Mg²⁺: Íon magnésio

μg : Micrograma
mg: Miligrama
mL: Mililitro
mOsm: Miliosmois
MP: Motilidade progressiva
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH-oxidoreductase: Nicotinamida adenina dinucleotídeo-oxidoreductase
NADPH-oxidase: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
NBT: Nitroblue Tetrazolium
NOS: Enzima óxido nítrico sintase
 O_2 : Oxigênio molecular
 $^1\text{O}_2$: Oxigênio singlete
 $\text{O}_2^{\cdot-}$: Ânion superóxido
 OH^{\cdot} : Radical hidroxila
 ON^{\cdot} : Óxido nítrico
 ONOO^- : Peroxinitrito
 OOH^{\cdot} : Radical peroxil
PMM: Potencial de membrana mitocondrial
PNA: *Arachis hypogaea agglutinin*
PSA: *Pisum sativum agglutinin*
Q: Quercetina
R: Resveratrol
RNA: Ácido ribonucleico
RNS: Espécies reativas ao nitrogênio
 ROO^{\cdot} : Radical peroxila
ROS: Espécies reativas ao oxigênio
RPE-PNA: Retinal pigmented epithelium-conjugated agglutin
SCSA: Avaliação da estrutura da cromatina espermática
S-H: Grupo sulfidríla
SOD: Superóxido dismutase
SOD-Cobre-Zinco: Superóxido dismutase-Cobre-Zinco
SOD-Manganês: Superóxido dismutase-Manganês
Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquemática das reações de Fenton e de Haber-Weiss.....	26
Figura 2 - Reação de dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2).....	34
Figura 3 - Reação de dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio molecular (O_2) e água (H_2O).....	34
Figura 4 - Reação de redução do H_2O_2 a H_2O , na presença de GSH-Px (1) e reação de regeneração da GSH (glutathiona reduzida) e GSSG (glutathiona oxidada) na presença de GSH-Px e GSH-Red (2 e 3).....	35

RESUMO

Objetivando-se avaliar o efeito da adição de diferentes crioprotetores (glicerol, etileno glicol ou acetamida) e antioxidantes (resveratrol – R e quercetina – Q) na viabilidade *in vitro* de amostras congeladas de sêmen ovino, foram utilizados quatro reprodutores adultos, mestiços da raça Santa Inês. Após colheita com vagina artificial, alíquotas de sêmen foram avaliadas macroscópica e microscopicamente e o *pool* de sêmen foi subdividido e diluído em Tris-gema, de acordo com os experimentos e grupos experimentais. No Experimento I, no qual foram avaliados os crioprotetores, os grupos experimentais foram classificados como: G1 = Tris-gema + 5% de glicerol; G2 = Tris-gema + 3% de etileno glicol; G3 = Tris-gema + 5% etileno glicol; G4 = Tris-gema + 2% de acetamida; e G5 = Tris-gema + 7% de acetamida. Em contrapartida, o Experimento II, no qual foram utilizados os tratamentos com antioxidantes, foi dividido em três subexperimentos: Exp. 1 [resveratrol (0, 5, 10, 15 e 20 µg/mL, respectivamente, R0, R5, R10, R15 e R20)]; Exp. 2 [quercetina (0, 5, 10, 15 e 20 µg/mL, respectivamente, Q0, Q5, Q10, Q15 e Q20)]; e Exp. 3 [sem antioxidante (RQ0), 10 µg/mL de resveratrol (R10), 5 µg de quercetina/mL (Q5), e 10 µg/mL de resveratrol + 5 µg/mL de quercetina (R10Q5)]. As alíquotas de sêmen, devidamente diluídas, foram então envasadas em palhetas (0,25 mL) e congeladas (-196 °C), sendo avaliadas após descongelação (37 °C/30 segundos) quanto a motilidade progressiva (MP), vigor, integridade de membrana plasmática (iMP), potencial de membrana mitocondrial (PMM) e integridade do acrossoma (iAC). Constatou-se que no Experimento I, o G1 apresentou MP superior ($P < 0,05$) a G3, G4 e G5; vigor superior ($P < 0,05$) a G4 e G5 e iMP superior ($P < 0,05$) a G2, G3, G4 e G5, sem evidenciar diferença significativa ($P > 0,05$) para PMM e iAC. No Experimento II, não se verificou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos para os parâmetros MP, vigor, iMP e iAC. O PMM apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais de seus três subexperimentos, de modo que no Exp. 1, o grupo R0 (36,67±8,01%) foi superior ao R20 (22,33±6,16%); no Exp. 2, o grupo Q0 (36,25±8,12%) foi superior ($P < 0,05$) ao Q10 (9,33±6,54%), Q15 (6,25±5,98%) e Q20 (5,17±5,08%), assim como o Q5 (20,58±12,05%) foi superior ($P < 0,05$) ao Q15 (6,25±5,98%) e Q20 (5,17±5,08%); e no Exp. 3, o grupo RQ0 (39,00±16,79%) foi superior ($P < 0,05$) ao Q5 (18,00±13,76%) e R10Q5 (14,42±7,47%). Conclui-se que o glicerol (5%) é mais eficaz na proteção dos espermatozoides ovinos submetidos aos efeitos deletérios da congelação do que o etileno glicol (3 e 5%) e a acetamida (2 e 7%), e que a adição dos antioxidantes fenólicos resveratrol e quercetina, isolados ou em associação, reduz o potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides ovinos submetidos à congelação, devendo outros estudos serem realizados visando avaliar diferentes concentrações, bem como o efeito da adição na taxa de fertilidade de ovelhas inseminadas artificialmente.

Palavras-chave: antioxidantes, congelação, crioprotetores, ovino, sêmen.

ABSTRACT

Aiming to evaluate the effect of adding different cryoprotectants (glycerol, ethylene glycol or acetamide) and antioxidants (resveratrol and quercetin) on *in vitro* viability of ram thawed semen samples, four adult males, Santa Ines crossbred, were used. After collect semen using an artificial vagina, aliquots of semen were evaluated macroscopic and microscopically and the pool of semen was divided and diluted in Tris-yolk medium, according to experiments and experimental groups. For the Experiment I, which evaluated the cryoprotectants addition, the experimental groups were classified as: G1 = Tris-yolk egg + 5% glycerol, G2 = Tris-yolk egg + 3% ethylene glycol, G3 = Tris-yolk egg + 5% ethylene glycol; G4 = Tris-yolk egg + 2% acetamide, G5 = Tris-yolk egg + 7% acetamide. However, the Experiment II, which were used the antioxidant treatments, was divided in three sub experiments: Exp 1 [resveratrol (0, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{g/mL}$, respectively, R0, R5, R10, R15 and R20)]; Exp 2 [quercetin (0, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{g/mL}$, respectively, Q0, Q5, Q10, Q15 and Q20)], and Exp 3 [without antioxidant (RQ0), 10 $\mu\text{g/mL}$ of resveratrol (R10), 5 $\mu\text{g/mL}$ of quercetin (Q5), and 10 $\mu\text{g/mL}$ of resveratrol + 5 $\mu\text{g/mL}$ of quercetin (R10Q5)]. After dilution, aliquots of semen were packed in straws (0.25 mL), frozen (-196 °C) and evaluated after thawing (37 °C/30 seconds) for progressive motility (PM), vigor, plasma membrane integrity (PMi), mitochondrial membrane potential (MMP) and acrosome integrity (ACi). It was found that in Experiment I, G1 showed higher PM ($P<0.05$) than G3, G4 and G5; vigor was higher ($P<0.05$) than G4 and G5; and PMi higher ($P<0.05$) than G2, G3, G4 and G5. However, there was no significant difference ($P>0.05$) among groups on the MMP and ACi parameters. In Experiment II, there was no difference among groups on the PM, vigor, PMi and ACi. MMP had significant difference ($P<0.05$) among experimental groups of their three sub experiments. So, in Exp 1, R0 group ($36.67\pm 8.01\%$) was higher than R20 ($22.33\pm 6.16\%$); in Exp 2, Q0 group ($36.25\pm 8.12\%$) was higher ($P<0.05$) than Q10 ($9.33\pm 6.54\%$), Q15 ($6.25\pm 5.98\%$) and Q20 ($5.17\pm 5.08\%$), and the Q5 ($20.58\pm 12.05\%$) was higher ($P<0.05$) than Q15 ($6.25\pm 5.98\%$) and Q20 ($5.17\pm 5.08\%$) groups; and in Exp 3, RQ0 group ($39.00\pm 16.79\%$) was higher ($P<0.05$) than Q5 ($18.00\pm 13.76\%$) and R10Q5 ($14.42\pm 7.47\%$) groups. It can be concluded that glycerol (5%) is more effective in protecting ram spermatozoa submitted to deleterious effects of freezing than ethylene glycol (3 and 5%) and acetamide (2 and 7%); the addition of resveratrol and quercetin phenolic antioxidants, alone or in combination, reduces mitochondrial membrane potential of sperm frozen ram; and other studies should be performed to evaluate different concentrations and the effect of the addition on the fertility rate of ewes inseminated artificially.

Keywords: antioxidants, cryoprotectants, freezing, ram, semen.

SUMÁRIO

Página

AGRADECIMENTOS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Célula Espermática e Sêmen	14
2.2 Criopreservação de Sêmen	15
2.2.1 Diluentes.....	16
2.2.2 Crioinjúrias.....	17
2.3 Crioprotetores	21
2.3.1 Crioprotetores não penetrantes.....	21
2.3.2 Crioprotetores penetrantes.....	22
2.4 Oxidantes	25
2.4.1 Origem dos oxidantes.....	25
2.4.2 Efeitos dos oxidantes sobre os espermatozoides.....	28
2.5 Antioxidantes	31
2.5.1 Terapia antioxidante	32
2.5.2 Antioxidantes enzimáticos.....	33
2.5.3 Antioxidantes não enzimáticos.....	35
2.6 Testes Laboratoriais para Avaliação Espermática	39
2.6.1 Avaliação da integridade de membrana plasmática.....	40
2.6.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	40
2.6.3 Acrossoma.....	41
2.6.4 Peroxidação lipídica.....	42
2.6.5 Capacitação.....	43
2.6.6 Associação de sondas.....	43
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
4 EXPERIMENTOS	58
4.1 Efeito da adição dos crioprotetores glicerol, etileno glicol e acetamida na viabilidade <i>in vitro</i> de espermatozoides criopreservados de ovinos	59
4.2 Efeito dos antioxidantes resveratrol e quercetina na viabilidade <i>in vitro</i> de espermatozoides congelados de ovinos	75
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	95

1 INTRODUÇÃO

A caprino-ovinocultura na região Nordeste desempenha um importante papel econômico e social, devido à boa adaptação dos animais ao clima e alimentação, muitas vezes escassa nesta região (CARVALHO e SOUZA, 2008). Na atualidade, o agronegócio da ovinocultura de corte está em ascensão no Brasil, especialmente como consequência da valorização do produto pelo consumidor (ARO et al., 2007), o que torna indispensável a mudança do sistema de criação estritamente familiar para um modelo de produção comercial, economicamente viável e planejado.

A ovinocultura no nordeste brasileiro cresceu significativamente nos últimos anos, tendo a exploração econômica dos rebanhos sido iniciada com a introdução de raças especializadas, do melhoramento genético e de técnicas de manejo que propiciaram a elevação da produtividade (VIANA, 2008). Apesar desses avanços e da detenção de um rebanho comercial relativamente grande (14 milhões de cabeças), o Brasil apresenta um histórico modesto de utilização de novas biotecnologias na produção de pequenos ruminantes. Segundo Carneiro (2007), é necessária a ampliação das técnicas de reprodução assistida com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva e a produtividade destes rebanhos, visando o melhor aproveitamento dos genótipos utilizados.

A criopreservação do sêmen, associada à inseminação artificial (IA), oferece muitas vantagens à indústria da produção animal (SALAMON e MAXWELL, 1995), especialmente relacionada aos programas de melhoramento animal. Entretanto, para alguns reprodutores, a conservação dos espermatozoides pelo frio torna-se um problema, particularmente quando armazenados congelados, resultando em alterações biológicas e funcionais destas células (ORTEGA et al., 2003), causando danos nas membranas espermáticas, redução da motilidade e da viabilidade espermática, e posteriores prejuízos durante o transporte espermático e a fertilização (SALAMON e MAXWELL, 1995; ORTEGA et al., 2003).

Embora o frio seja o promotor mais eficiente do estado de anabiose (MIES FILHO, 1982), sua utilização na preservação de sêmen, por refrigeração ou congelamento, representa evento atípico e estressante para a viabilidade dos espermatozoides. Deste modo, é normal que os espermatozoides submetidos ao frio apresentem fertilidade inferior a daqueles *in natura* (STORNELLI et al., 2005), em virtude das injúrias

causadas principalmente durante os procedimentos de congelamento (ORTEGA et al., 2003).

Diversos estudos relatam as dificuldades encontradas para a criopreservação do sêmen ovino e as baixas taxas de concepção obtidas com o uso do sêmen congelado desta espécie na IA. Visando amenizar os danos celulares ocorridos durante o processo de congelamento do sêmen, compensar a remoção do plasma seminal e reduzir os danos oxidativos, pesquisadores têm estudado o efeito de diferentes crioprotetores na preservação dos espermatozoides (MORAES et al., 1998; BRISOLA et al., 1999; MANTOVANI et al., 2002; SOARES et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2004; BRANDÃO et al., 2006; KASHIWAZAKI et al., 2006; CASTRO et al., 2007; SNOECK et al., 2007; JULIANI e HENRY, 2008), bem como a adição de substâncias antioxidantes ao sêmen durante a manipulação em laboratório (BAUMBER et al., 2003; PEÑA et al., 2003; RUIZ et al., 2007; SILVA et al., 2009), nas diferentes espécies, a fim de manter a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides (GUERRA et al., 2004).

Diante do exposto, evidencia-se a necessidade da realização de estudos para a identificação de substâncias crioprotetoras e antioxidantes capazes de determinar menor estresse oxidativo e danos espermáticos, com o consequente aumento na preservação da capacidade fecundante dos espermatozoides ovinos, possibilitando a elaboração de diluente mais eficaz para esta espécie. Desta forma, objetivou-se com a realização deste trabalho, avaliar o efeito da adição de diferentes crioprotetores (glicerol, etileno glicol e acetamida) e substâncias antioxidantes (resveratrol e/ou quercetina) na viabilidade *in vitro* de amostras congeladas de sêmen ovino da raça Santa Inês.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Célula Espermática e Sêmen

Os espermatozoides foram observados em 1677 por Van Leeuwenhoek (SIKKA, 1996; PESCH e BERGMANN, 2006; SILVA e GADELLA, 2006) e classificados como células terminais, desprovidas de capacidade reparadora (PURDY, 2006b), e morfologicamente divididas em cabeça, colo e cauda (SINGH, 2006). Esses gametas são produzidos nos testículos, por um processo conhecido como espermatogênese, e maturados no epidídimo (SETCHELL, 1993), constituindo o sêmen quando em associação às secreções dos órgãos acessórios do sistema genital masculino (NALBANDOV, 1976; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A cabeça do espermatozoide é constituída por acrossoma e núcleo, sendo o acrossoma uma organela originada a partir do complexo de Golgi, que contém enzimas hidrolíticas em seu interior, tais como a pró-acrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas, as quais são liberadas durante o processo de reação acrossomal para que haja a penetração do espermatozoide no oócito (PESCH e BERGMANN, 2006). Conseqüentemente, a integridade desta estrutura deve ser mantida até que a zona de ligação entre o gameta masculino e feminino esteja completa (SILVA e GADELLA, 2006), uma vez que apenas espermatozoides com acrossomas normais e intactos são capazes de sofrer reação acrossomal, essencial à fertilização (ESTEVEZ et al., 2000).

Por sua vez, o núcleo do espermatozoide retém a cromatina condensada com as informações genéticas, sendo este processo indispensável à manutenção de sua integridade para que haja o perfeito desenvolvimento embrionário e para que a gestação seja levada a termo (MORAES et al., 1998). Neste contexto, existem evidências de que os defeitos na estrutura nuclear apresentam correlação positiva com a redução da capacidade fertilizante dos espermatozoides e desenvolvimento de defeitos embrionários precoces (PESCH e BERGMANN, 2006), tornando o potencial de fertilidade das células espermáticas um reflexo do estado da cromatina espermática (EVENSON et al., 1999).

O colo do espermatozoide representa a pequena área de ligação entre a cabeça e a peça intermediária que encerra os centríolos proximais (MIES FILHO, 1982), enquanto a cauda corresponde à parte mais longa do espermatozoide, formada pelas

peças intermediária, principal e terminal (SINGH, 2006). A peça intermediária é de estrutura complexa e caracterizada pela presença da bainha mitocondrial (MIES FILHO, 1982; CARVALHO et al., 2002), responsável pela geração da energia utilizada pelo axonema para execução dos movimentos flagelares (CARVALHO et al., 2002; HAFEZ e HAFEZ, 2004; SINGH, 2006), essenciais para que os espermatozoides de mamíferos alcancem o local da fertilização e possam dar início a este processo (PESCH e BERGMANN, 2006).

Toda a extensão da célula espermática é recoberta pela membrana plasmática, a qual mantém o gradiente químico de íons e outros componentes solúveis por meio de sua característica de semipermeabilidade (SILVA e GADELLA, 2006). Deste modo, para que os espermatozoides tenham sucesso na fertilização, é necessário que apresentem membranas e organelas funcionais e genoma haploide intacto, visto que apenas nestas condições os gametas masculinos podem sofrer capacitação, reação acrossomal e hiperativação (SILVA e GADELLA, 2006), essenciais ao processo de fertilização (LADHA, 1998).

2.2 Criopreservação do Sêmen

A congelação dos espermatozoides foi iniciada, com fins científicos, por Lazaro Spallanzani em 1776 (PESCH e BERGMANN, 2006). Entretanto, apenas após a descoberta dos crioprotetores, a técnica de armazenamento do sêmen foi revolucionada e as pesquisas nesta área, impulsionadas (HOLT, 2000b; PESCH e BERGMANN, 2006). A partir de então, tornou-se possível a congelação, o armazenamento por período prolongado e a utilização de espermatozoides criopreservados para a inseminação artificial com sucesso (HOLT, 2000b).

Com relação à espécie ovina, as investigações relacionadas a IA foram iniciadas no início do século XX por Ivanov e o primeiro registro de congelação de sêmen foi de Bernstein e Petropavlovsky (1937), os quais ficaram conhecidos por empregar solução de glicerol no armazenamento do sêmen de mamíferos e aves (SALAMON e MAXWELL, 2000). A partir do desenvolvimento das técnicas de preservação e estocagem do sêmen ovino, foi possível utilizar melhor os animais de alto potencial genético, preservar o material genético de animais permanentemente ou

temporariamente inábeis à reprodução e transportar o sêmen a longas distâncias (MELO et al., 2007).

O uso do sêmen congelado para a IA oferece notáveis benefícios práticos à reprodução (FICKEL et al., 2007). Entretanto, a congelabilidade do sêmen sofre influência de variações específicas (BAILEY e BUHR, 1995; HAFEZ e HAFEZ, 2004; STORNELLI et al., 2005) e individuais, as quais são descritas como provenientes de diferenças biofísicas e bioquímicas das membranas dos espermatozoides (HAFEZ e HAFEZ, 2004), tornando essencial a otimização da técnica de congelamento de acordo com o tipo de sêmen trabalhado (ORTEGA, 2003), a qual deve contemplar não apenas a conservação de um elevado número de espermatozoides sobreviventes, mas também a habilidade fertilizante desta população (STORNELLI et al., 2005).

É provável que os espermatozoides ovinos, quando submetidos à congelamento, apresentem falhas no transporte através do sistema genital feminino, especialmente após a IA cervical, o que é agravado pela redução da longevidade das células espermáticas e pelo choque de temperatura em faixas abaixo de 0 °C, especialmente entre -10 e -30 °C (MIES FILHO, 1982). Este quadro justifica, portanto, as baixas taxas de fertilidade obtidas com o sêmen congelado em relação àquele *in natura* (POLGE, 1976; LEBOEUF et al., 2000; FOOTE, 2002; MARTI et al., 2008) e a limitada aplicabilidade deste material para a IA (POLGE, 1976; MARTI et al., 2008), particularmente aquele utilizado pela via cervical em ovinos (MORAES et al., 1998).

2.2.1 Diluentes

Os ambientes químicos e osmóticos dos espermatozoides exercem importante papel sobre sua sobrevivência (HOLT, 2000b), tornando indispensável que os diluentes utilizados para a preservação do sêmen ovino, bem como de outras espécies, apresentem pH e osmolaridade adequados e capacidade protetora contra as crioinjúrias (SALAMON e MAXWELL, 2000). No meio diluidor geralmente estão presentes carboidratos, como fonte de energia; crioprotetores não penetrantes que, além de terem função nutritiva, protegem as células contra o choque frio à medida que os espermatozoides são refrigerados até 5 °C; tampões para manutenção do pH próximo da neutralidade e da pressão osmótica aproximada de 300 mOsm; antibióticos para inibir o crescimento microbiano no sêmen; e crioprotetores penetrantes para proteger os espermatozoides dos efeitos da congelamento (HAFEZ e HAFEZ, 2004; PURDY, 2006a).

Os diluidores utilizados para a congelação dos espermatozoides ovinos são, especialmente à base de gema de ovo e/ou de leite, tais como o citrato-glucose-gema de ovo, citrato-frutose-gema de ovo, leite-glucose-gema de ovo (SALAMON e MAXWELL, 2000), rafinose-citrato de sódio-gema de ovo-glicerol (TASSERON et al., 1977), lactose-gema de ovo-glicerol (COLAS, 1975) e Tris-gema de ovo-glicerol (FOOTE, 2002). Em contrapartida, diluidores à base de água de coco (ACP-102) (FIGUEIRÊDO et al., 2007) e lecitina de soja têm sido utilizados com sucesso para a criopreservação de espermatozoides de carneiros (FUKUI et al., 2008).

2.2.2 Crioinjúrias

Apesar da criopreservação do sêmen oferecer, em associação à IA, muitas vantagens à indústria da produção animal (SALAMON e MAXWELL, 1995), ela representa um problema para alguns reprodutores (ORTEGA et al., 2003). Isso porque o armazenamento do sêmen, particularmente no estado congelado, determina, ao longo de todas as etapas da criopreservação (TASSERON et al., 1977), mudanças nas características espermáticas (ESTEVES et al., 2000) pela determinação de danos letais ou subletais (STORNELLI et al., 2005) a níveis ultraestruturais (físicos), bioquímicos e funcionais, com concomitante redução da motilidade, viabilidade, capacidade de transporte ao longo do sistema genital feminino e fertilidade (SALAMON e MAXWELL, 1995; LEBOEUF et al., 2000).

Durante a etapa de diluição do sêmen, a manifestação de mudanças drásticas de pH estão relacionadas com a geração de danos espermáticos, infertilidade e perda de motilidade (PURDY, 2006a). Da mesma forma, osmolaridades acima de 300 mOsm podem ser associadas à redução da integridade celular (CURRY et al., 1994; MOLINIA et al., 1994), fatores que tornam indispensável o controle da variação do pH e da osmolaridade para que a viabilidade e a habilidade fertilizante dos espermatozoides sejam preservadas, devendo o sêmen ovino ser mantido em uma faixa de pH 6,8 e de osmolaridade entre 250 e 400 mOsm (MOLINIA et al., 1994).

Embora indispensáveis para a preservação dos espermatozoides pelo frio, os crioprotetores submetem esses gametas ao estresse osmótico e a efeitos tóxicos, o que depende de sua permeabilidade relativa (WATSON, 2000) e de variações espécie-específicas relacionadas à sensibilidade dos espermatozoides à ação deletéria destes agentes e a geração de injúrias (KASHIWAZAKI et al., 2006). Por conseguinte, danos

espermáticos ocorrem devido à concentração do crioprotetor (BRISOLA et al., 1999), a temperatura (COLAS, 1975) e a velocidade de resfrieração e/ou congelação (ÁVILA-PORTILLO et al., 2006), de acordo com a espécie utilizada (SQUIRES et al., 2004; KASHIWAZAKI et al., 2006).

No sêmen criopreservado, o número de células com injúrias e apoptóticas aumenta consideravelmente em relação ao *in natura*, independente da técnica de congelação e descongelação utilizada (ORTEGA et al., 2003). As crioinjúrias decorrem da interação entre as mudanças biofísicas, bioquímicas e ambientais ocorridas durante o processo de criopreservação (FICKEL et al., 2007), submetendo as células criopreservadas a estresses resultantes das mudanças de volume e consequentes alterações nas concentrações de íons e eletrólitos nas soluções intra e extracelulares (STORNELLI et al., 2005). Estas alterações são decorrentes da interação água-soluto denominadas efeito solução, e do choque frio, que consiste na exposição dos espermatozoides a baixas temperaturas não fisiológicas (HOLT, 2000b).

As crioinjúrias podem ser classificadas, de acordo com sua origem, em primárias, oriundas da ação direta dos cristais de gelo formados durante o choque frio, e secundárias, determinadas pelo efeito solução por meio do incremento da concentração de solutos, na medida em que o gelo é progressivamente produzido (PESCH e BERGMANN, 2006). Deste modo, uma taxa de refrigeração ótima deve ser lenta o bastante para prevenir a formação letal de cristais de gelo intracelular e rápida o suficiente para minimizar os efeitos nocivos da prolongada exposição a altas concentrações de sais (HOLT, 2000b), uma vez que tais eventos comprometem a sobrevivência (CURRY et al., 1994) e a fertilidade espermática (ARRUDA et al., 2007).

Em contrapartida, a descongelação consiste na inversão das mudanças ocasionadas pelos processos de refrigeração e congelação, sendo observado durante esta etapa, o decréscimo na concentração intracelular de soluto e a restauração da concentração de água intracelular e do volume celular (HOLT et al., 1992). Apesar de a descongelação estar ligada ao restabelecimento das características celulares, esta pode ocasionar peroxidação lipídica e danos à membrana, decorrentes do rápido aumento da utilização de oxigênio pelo espermatozoide (GUERRA et al., 2004), assim como a ruptura da membrana através do excessivo fluxo de água para o interior da célula (HOLT, 2000b), sendo indispensável que as técnicas de descongelação sejam determinadas de acordo com o método de congelação utilizado (PURDY, 2006a),

devendo ser rápida o suficiente para evitar a recristalização (ÁVILA-PORTILLO et al., 2006).

É peculiar ao sêmen criopreservado a manutenção de um menor número de espermatozoides morfologicamente normais (O'CONNELL et al., 2002), assim como a perda da motilidade celular (WATSON, 2000). Com relação à motilidade, sua perda tem sido descrita como oriunda tanto de danos causados à membrana quanto da disfunção mitocondrial (AURICH, 2005), tendo sido relatado que as membranas plasmática e mitocondrial são afetadas de modo similar pelo processo de criopreservação (O'CONNELL et al., 2002).

O comprometimento da motilidade espermática é justificado por alterações na membrana plasmática, que provocam diferenças na concentração de cálcio intracelular (SIKKA, 2004), enquanto que nas mitocôndrias, isto decorre do comprometimento das atividades desta estrutura e da conseqüente redução das taxas de ATP nas células (HOLT et al., 1992). Outra possibilidade para a perda da motilidade durante o processo de criopreservação é o desenvolvimento de anormalidades na cauda (O'CONNELL et al., 2002), com destaque para aquelas relacionadas ao axonema (HOLT et al., 1992).

A integridade da membrana plasmática parece ser o parâmetro espermático mais afetado pela criopreservação (ÁVILA-PORTILLO et al., 2006; ARRUDA et al., 2007), uma vez que as mudanças de temperatura submetem as membranas a estresses oriundos da fase de transição de sua estrutura do estado líquido cristalino para o de gel (CANISSO et al., 2008), promovendo mudanças na sua função (WATSON, 2000). Como conseqüência disto, ocorrem danos às membranas acrossomais e mitocondriais (QUINN et al., 1980), assim como reação acrossomal prematura (LEBOEUF et al., 2000), o que leva os espermatozoides com membranas plasmáticas danificadas a serem considerados incapazes de promover a fertilização *in vivo* (SILVA e GADELLA, 2006), uma vez que apenas espermatozoides com membranas intactas podem sofrer capacitação e reação acrossomal (PESCH e BERGMANN, 2006).

Nas diferentes espécies de mamíferos, mais de 60% dos lipídeos presentes na membrana plasmática dos espermatozoides são ácidos graxos poli-insaturados, o que confere a esta estrutura grande fluidez devido à quantidade de duplas ligações ou ligações insaturadas existentes (VALENÇA e GUERRA, 2007). Em contrapartida, a variação na composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides tem sido considerada fator determinante para a viabilidade do ejaculado submetido aos processos de congelamento (VALENÇA e GUERRA, 2007), o que pode ser justificado pelo fato de

os lipídios constituírem um dos principais substratos das ROS (SIKKA, 1996), as quais têm sua produção intensificada durante a criopreservação, com geração de danos oxidativos e prejuízo das funções espermáticas (WATSON, 2000).

Na espécie ovina, a elevada concentração de ácidos graxos insaturados nas membranas espermáticas consiste no problema básico, responsável pela limitação da congelação do sêmen dessa espécie, uma vez que os lipídeos tendem a se ligar ao oxigênio e sofrer peroxidação (SANOCKA e KURPISZ, 2004). Subsequentemente à peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana plasmática dos espermatozoides, é observada perda de fluidez da membrana e das funções celulares (SANOCKA e KURPISZ, 2004), fatores que comprometem a capacidade fertilizante do espermatozoide (SARLÓS et al., 2002) e os resultados após IA (BRISOLA et al., 1999).

O número de espermatozoides viáveis e com mitocôndrias funcionais decresce significativamente após a criopreservação (O'CONNELL et al., 2002), uma vez que esta biotécnica compromete a arquitetura (SALAMON e MAXWELL, 2000) e o potencial de membrana das organelas destes gametas (PAASCH et al., 2004). A deterioração do DNA mitocondrial (DNAm_t) apresenta correlação positiva com o decréscimo da motilidade espermática (MARCHESI e FENG, 2007), em virtude desta ser dependente da atividade mitocondrial e de sua produção energética (RUIZ-PESINI et al., 1998; FRASER et al., 2001; ZINI e LIBMAN, 2006), o que torna indispensável a preservação da integridade estrutural e funcional desta organela.

O número de espermatozoides com acrossomas reagidos também aumenta consideravelmente após a criopreservação (PERIS et al., 2004), fato que sofre interferência direta do incremento de Ca^{2+} intracelular, gerado durante o processo de armazenamento do sêmen (SANOCKA e KURPISZ, 2004). A reação acrossomal é marcada pela fusão entre a membrana plasmática e a acrossomal externa, resultando na formação de vesículas e permitindo a liberação das enzimas do conteúdo acrossomal (CARVALHO et al., 2002), de modo que, quando precoce, determina infertilidade (SILVA e GADELLA, 2006) e aumento da susceptibilidade à desnaturação do DNA nuclear (PERIS et al., 2004).

Com base nas informações anteriores é notável que, embora a capacitação seja um processo fisiológico, marcado inicialmente por alterações na membrana plasmática (permeabilidade em relação ao transporte de íons cálcio) e consequentes modificações morfológicas (reação acrossomal) e fisiológicas (hiperativação do flagelo) (CARVALHO et al., 2002), esta pode ocorrer durante a criopreservação (WATSON,

1995; MORTIMER e MAXWELL, 2004) como resultado das variações de temperatura (STORNELLI et al., 2005). Neste caso, a capacitação espermática passa a ser denominada de criocapacitação, sendo frequentemente observada em espermatozoides ovinos submetidos aos processos de congelamento e descongelamento (WATSON, 1995; MORTIMER e MAXWELL, 2004), podendo resultar em comprometimento da fertilidade e capacidade fertilizante destas células (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Em termos gerais, é possível verificar que a criopreservação ocasiona decréscimo dos parâmetros espermáticos básicos (PERIS et al., 2004) e, por conseguinte, dos índices de fertilidade após IA com sêmen congelado (BRISOLA et al., 1999). Tais efeitos negativos justificam, portanto, a necessidade de melhorias na qualidade do sêmen ovino congelado, o que tem sido foco de muitas pesquisas a fim de aumentar os índices de nascimento em ovelhas inseminadas, particularmente, por via cervical, pelo fato de esta ser uma técnica mais acessível e de simples aplicação do que a laparoscópica (MORAES et al., 1998).

2.3 Crioprotetores

Os crioprotetores são classificados como penetrantes e não penetrantes nas células e são acrescidos ao meio de criopreservação com a finalidade de minimizar os estresses físicos e químicos resultantes da refrigeração, congelamento e descongelamento dos espermatozoides (PURDY, 2006a). O efeito protetor destes agentes decorre de suas propriedades coligativas, o que determina a redução da formação de gelo como consequência da redução do ponto eutético e da desidratação da célula e de sua exposição a um menor gradiente osmótico (ÁVILA-PORTILLO et al., 2006).

2.3.1 Crioprotetores não penetrantes

Os crioprotetores não penetrantes são macromoléculas crioprotetoras que se dispõem entre a membrana plasmática e os fluidos hiperosmóticos que a rodeiam durante a congelamento (HOLT et al., 1992), sendo sua ação crioprotetora efetiva, mesmo quando são utilizadas elevadas velocidades de congelamento, o que se deve à promoção de uma rápida desidratação celular (ÁVILA-PORTILLO et al., 2006). Dentre os crioprotetores não penetrantes de maior destaque estão a gema de ovo e o leite

desnatado, embora outros agentes também possam ser utilizados com a mesma finalidade, como é o caso de alguns aminoácidos e açúcares (PURDY, 2006a).

A gema de ovo é comumente utilizada nos diluidores seminais pelo fato de proteger as células durante as etapas de congelação e descongelação (SALAMON e MAXWELL, 2000), uma vez que seus fosfolipídeos e lipoproteínas de baixa densidade possuem efeito protetor contra o choque frio (STORNELLI et al., 2005). Além disso, a gema de ovo, da mesma forma que o leite, inibe a peroxidação lipídica dos espermatozoides (JONES e MANN, 1977b), sendo provável que sua ação protetora ocorra na membrana (SALAMON e MAXWELL, 2000), visto que na presença deste elemento, os danos à membrana plasmática, produzidos durante os processos de congelação e descongelação, são reduzidos (HOLT et al., 1992).

Dentre os açúcares utilizados nos meios diluidores para criopreservação seminal estão os açúcares simples, como a frutose e a glicose que desempenham papel nutritivo, e os açúcares não penetrantes na célula, como a lactose, a rafinose e a trealose que exercem função crioprotetora não penetrante (SQUIRES et al., 2004; PURDY, 2006a). O princípio de atuação dos açúcares não penetrantes se baseia na elevação da pressão osmótica e subsequente desidratação celular, com redução da formação de gelo intracelular, sendo por isso comumente utilizados nos meios de congelação de espermatozoides e oócitos por minimizarem o estresse osmótico, causado durante a etapa de refrigeração (SQUIRES et al., 2004). Além disso, os açúcares podem interagir com os fosfolipídeos da membrana plasmática, reorganizando-a e, a partir disto, aumentando a capacidade de sobrevivência dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação (PURDY, 2006a).

2.3.2 Crioprotetores penetrantes

Os crioprotetores penetrantes são permeáveis às membranas e atuam intra e extracelularmente visando promover a desidratação celular. Através deste processo de desidratação, o ponto de congelação da célula é reduzido, resultando em menor formação de gelo intracelular e consequente manutenção da sobrevivência e fertilidade dos espermatozoides (PURDY, 2006a).

Os crioprotetores penetrantes foram classificados por Ashwood-Smith (1987) em dois grupos, o dos alcoólicos e o das amidas. Dentre os crioprotetores alcoólicos utilizados para a preservação espermática, destacam-se, especialmente, o glicerol, o

etileno glicol (FICKEL et al., 2007) e o metanol (SILVA, 2007); entre as amidas citam-se a acetamida, a lactamida (KASHIWAZAKI et al., 2006), a dimetilformamida (OLIVEIRA et al., 2006; SILVA et al., 2006) e a dimetilacetamida (CALDERAM et al., 2008).

A partir da descoberta do glicerol como crioprotetor, as pesquisas sobre congelação de sêmen sofreram grandes avanços (MORAES et al., 1998) e este agente passou a ser utilizado quase que universalmente nos processos de congelação do sêmen (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Na espécie ovina, o glicerol é o crioprotetor penetrante mais comumente utilizado e sua concentração ótima foi estabelecida entre seis e oito por cento, apresentando maior penetrabilidade em espermatozoides ovinos do que em espermatozoides bovinos (SALAMON e MAXWELL, 2000).

O completo mecanismo de ação do glicerol para a proteção das células espermáticas, ainda não está totalmente estabelecido (MORAES et al., 1998), entretanto, sabe-se que este é um crioprotetor penetrante que atua sobre a membrana plasmática para sua estabilização, evitando, a partir disto, a formação de danos sobre esta estrutura, gerados pela exposição da célula a elevadas concentrações de sais durante a congelação (HOLT et al., 1992). Além disso, este crioprotetor modifica a formação de cristais de gelo, de modo que a lesão mecânica das células espermáticas durante a cristalização é reduzida, uma vez que este agente penetra na célula e substitui parcialmente seu conteúdo de água e de eletrólitos (SINGH, 2006).

Em contrapartida, a eficácia dos crioprotetores para a congelação de sêmen sofre a influência de variações espécie-específicas (KASHIWAZAKI et al., 2006; OKUDA et al., 2007) e individuais (GARNER et al., 1999), o que está relacionado não apenas às diferenças na permeabilidade da membrana, mas a todos os aspectos estruturais e funcionais da mesma (HOLT, 2000b). Atualmente estas variações são descritas como provenientes de diferenças na ativação energética necessária para o influxo de água e crioprotetores na célula, o que tem sido relacionado à presença ou não de canais proteicos de água, chamados Aquaporinas (AQP7), na membrana celular (KASHIWAZAKI et al., 2006; OKUDA et al., 2007), os quais, possivelmente, tornam as células altamente permeáveis a água com concomitante baixa ativação energética para a passagem da mesma (ÁVILA-PORTILLO et al., 2006).

Para o armazenamento dos espermatozoides ovinos, a concentração de glicerol nos diluentes de congelação é limitada em decorrência de sua toxicidade, o que sofre interferência da taxa de refrigeração e congelação utilizada, da composição e da pressão

osmótica do diluente, e do método de adição do crioprotetor (SALAMON e MAXWELL, 2000). Assim, quando usado em um diluidor com elevadas concentrações de gema de ovo a concentração de glicerol requerida é menor (SALAMON e MAXWELL, 2000) e em meios à base de Tris, este crioprotetor pode ser adicionado em uma única etapa no meio inicial usado para a refrigeração do sêmen (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Como consequência dos efeitos tóxicos do glicerol sobre os espermatozoides (ALVARENGA, et al., 2005), têm sido desenvolvidas inúmeras investigações com o objetivo de identificar crioprotetores alternativos (OKUDA et al., 2007). Neste contexto, o etileno glicol tem se destacado em virtude de sua superior capacidade crioprotetora em relação ao glicerol, determinando maior proteção do acrossoma (MORAES et al., 1998) e das membranas espermáticas de espermatozoides ovinos, quando em concentrações mais baixas (0,5 M), o que pode se estender a outras estruturas, tais como o núcleo (BRISOLA et al., 1999).

Quando utilizado em elevadas concentrações, o etileno glicol apresenta desempenho negativo sobre os espermatozoides, o que foi observado após criopreservação de espermatozoides ovinos com 0,7 M (MORAES et al., 1998) e de espermatozoides caprinos com 7% deste crioprotetor (SOUZA et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2004). Deste modo, são necessárias menores concentrações de etileno glicol do que de glicerol para obtenção de índices ideais de criopreservação do sêmen ovino (MORAES et al., 1998), uma vez que elevadas concentrações deste agente determinam efeito tóxico sobre os espermatozoides (BITTENCOURT et al., 2004).

As amidas também têm sido testadas como crioprotetor alternativo e, em virtude de muitas destas apresentarem um menor peso molecular do que o glicerol supõe-se que possam induzir a menores danos osmóticos (ALVARENGA et al., 2005; MELO et al., 2007). Embora ainda não existam estudos da permeabilidade das amidas em relação à membrana plasmática dos espermatozoides, especula-se que, em virtude das diferenças na permeabilidade e no peso molecular destas em relação ao glicerol, as taxas de refrigeração e congelação mais rápidas, sejam mais desejáveis para a criopreservação do sêmen diluído na presença das amidas (ALVARENGA et al., 2005).

Em experimentos realizados por Kashiwazaki et al. (2006), utilizando acetamida e lactamida a 1 M, e por Okuda et al. (2007), usando acetamida a 2%, foi observada superior capacidade crioprotetora das amidas, em relação ao glicerol, para a criopreservação de espermatozoides de coelhos. Em contrapartida, quando adicionadas

aos espermatozoides de equinos, amidas como a acetamida e a formamida apresentaram baixo efeito protetor, o que comprova a existência de diferenças espécies-específicas, bem como individuais, à ação das amidas como crioprotetores (SQUIRES et al., 2004).

2.4 Oxidantes

As espécies reativas ao oxigênio (ROS) consistem em uma variedade de moléculas e radicais livres (TURRENS, 2003) produzidos nos sistemas biológicos, a partir do metabolismo do oxigênio (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), que podem modificar as funções celulares e/ou comprometer a sobrevivência da célula (CARVALHO et al., 2002; SALEH e AGARWAL, 2002). Isso porque, as ROS, embora sejam produzidas fisiologicamente durante o metabolismo celular normal (SANOCKA e KURPISZ, 2004) e exerçam papel fisiológico sobre as células, desencadeiam efeito patológico quando produzidas em excesso (MARCHESI e FENG, 2007).

Os oxidantes apresentam diferenças quanto as suas propriedades físicas e químicas e sua ação tóxica sofre interferência dos metais de transição (BLAKE et al., 1987). As ROS que geram maiores implicações na biologia reprodutiva e fertilização são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o altamente reativo radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o radical peroxila (ROO^{\cdot}) (SIKKA, 1996; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006). Além destes, existem ainda os oxidantes derivados do nitrogênio, os quais podem ser denominados de espécies reativas ao nitrogênio (RNS) (TURRENS, 2003), com destaque para o óxido nítrico (ON^{\cdot}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$).

2.4.1 Origem dos oxidantes

- Ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O ânion superóxido é originado a partir da primeira redução do oxigênio molecular (O_2) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), ou seja, de sua redução univalente (BLAKE et al., 1987), evento que pode ser de origem enzimática ou não enzimática (TURRENS, 2003). A fonte enzimática de $O_2^{\cdot-}$ está relacionada às NADPH oxidases localizadas na membrana celular, enquanto que a fonte não enzimática

depende da existência de elétrons desemparelhados/livres (singlete) para ocorrer, sendo estes elétrons transferidos diretamente para o oxigênio durante tal processo (TURRENS, 2003).

A produção espermática de $O_2^{\cdot-}$, assim como a de ON^{\cdot} , é significativamente mais elevada em populações de espermatozoides defeituosos (BAKER e AITKEN, 2005). Apesar de ser um radical livre (ALVAREZ e MORAES, 2006) e possuir capacidade redutora de íons ferro e cobre (BLAKE et al., 1987), o $O_2^{\cdot-}$ não apresenta alta reatividade, o que se deve à sua impenetrabilidade em membranas celulares (ALVAREZ e MORAES, 2006). Deste modo, as características de baixa solubilidade e curta meia vida do $O_2^{\cdot-}$ são responsáveis por sua limitada difusão, longe do seu sítio de formação (BLAKE et al., 1987).

- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio é uma ROS formada a partir da redução divalente do O_2 ou da redução univalente do $O_2^{\cdot-}$, que possui longa vida e elevada permeabilidade nas membranas, características que possibilitam sua difusão à distância, não apresentando ação restrita ao sítio de formação (BLAKE et al., 1987). Como consequência de sua maior permeabilidade nas membranas biológicas, o H_2O_2 parece ser mais apto a afetar sistemas enzimáticos intracelulares (BAUMBER et al., 2000), representando, de acordo com inúmeros estudos, o agente oxidante que mais causa danos aos espermatozoides *in vitro* (ALVAREZ e MORAES, 2006), tendo sua toxicidade potencializada na presença de metais de transição, os quais atuam como catalisadores das reações oxidativas, através das reações de Fenton e de Haber-Weiss (Figura 1) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

REAÇÃO DE FENTON	REAÇÃO DE HABER-WEISS
$Fe^{2+} + O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} + O_2^{\cdot-}$	$Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \leftrightarrow Fe^{2+} + O_2$
$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$
$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$	$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$

Figura 1 - Esquematização das reações de Fenton e de Haber-Weiss.

Fonte: Ferreira e Matsubara (1997).

- Radical hidroxila (OH^\bullet)

O radical hidroxila é uma ROS formada a partir da redução do H_2O_2 na presença de metais de transição, especialmente ferro e cobre (BLAKE et al., 1987; AGARWAL e SALEH, 2002; TURRENS, 2003), embora também possa ser originado a partir $\text{O}_2^{\bullet-}$ (BURCHAM, 1998) e da reação entre $\text{O}_2^{\bullet-}$ e ON^\bullet (ALVAREZ e MORAES, 2006). Apesar de sua curta meia vida e conseqüente limitada capacidade de difusão, o OH^\bullet representa um oxidante extremamente reativo que altera as moléculas localizadas nas proximidades de seu sítio de formação (BLAKE et al., 1987), sendo por isso considerada a ROS mais deletéria ao organismo (BARREIROS et al., 2006) e que serve como um potente indicador da cascata de peroxidação lipídica e de perda das funções espermáticas (AGARWAL e SALEH, 2002).

O OH^\bullet é responsável por ocasionar danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídeos e membranas celulares (BARREIROS et al., 2006). Ao nível de DNA, este oxidante atinge tanto a desoxirribose quanto as bases nitrogenadas, resultando na ruptura da cadeia do DNA e na fragmentação oxidativa das bases nitrogenadas (BARREIROS et al., 2006). Por outro lado, os ataques aos aminoácidos constituintes das proteínas podem determinar danos como clivagem de ligações e ligações cruzadas, as quais podem ter como conseqüência a perda da atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular (BARREIROS et al., 2006). Com relação aos lipídeos, estes são atacados mais comumente pelo OH^\bullet ao nível de membranas, sendo os ácidos graxos poli-insaturados mais susceptíveis aos ataques das ROS devido ao carbono metilênico bis-alfílico (BARREIROS et al., 2006).

- Radical peroxila (ROO^\bullet)

O radical peroxila é um oxidante formado durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica (VASCONCELOS et al., 2007). Representa a forma protonada do ânion superóxido e, possivelmente, é mais reativo do que este em decorrência de sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

- Óxido nítrico (ON[•])

O óxido nítrico é uma RNS sintetizada nos organismos vivos pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), sendo encontrado em abundância em sistemas biológicos (VASCONCELOS et al., 2007). Este agente oxidante apresenta ação citotóxica e citostática, podendo determinar redução da motilidade e da viabilidade espermática (CARVALHO et al., 2002), embora seu efeito deletério dependa da concentração em que está presente e da interação com o peróxido de hidrogênio (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006).

- Peroxinitrito (ONOO⁻)

O peroxinitrito é um potente oxidante originado a partir da reação entre ON[•] e O₂^{•-}, demonstrando instabilidade e possuindo curto tempo de vida, apresentando propriedades semelhantes às do radical OH[•]. O ONOO⁻ é responsável por ocasionar danos a inúmeras moléculas biológicas, dentre as quais estão os grupos sulfidrila (S-H) das proteínas, e estimular a formação de OH[•], independente da presença de metais de transição (VASCONCELOS et al., 2007).

2.4.2 Efeitos dos oxidantes sobre os espermatozoides

Embora ainda não se saiba o limite entre os níveis fisiológicos e patológicos das ROS (NOVOTNÝ et al., 2003), baixas e controladas concentrações destes agentes desempenham importante papel na fisiologia espermática, sendo responsáveis por tornar os espermatozoides aptos a fertilização, através do desencadeamento de processos oxidativos como a hiperativação, capacitação e reação acrossomal (De LAMIRANDE et al., 1997; SANOCKA e KURPISZ, 2004). Dentro deste contexto, o O₂^{•-} e o H₂O₂ exercem papel determinante sobre a modulação da atividade de genes e de proteínas essenciais para a função dos espermatozoides (MARCHESI e FENG, 2007), além de promoverem a fosforilação da tirosina para que haja a capacitação espermática (BAKER e AITKEN, 2005; MARCHESI e FENG, 2007).

Por outro lado, o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, desencadeia o estresse oxidativo (SIKKA, 2004), que consiste em uma reação em cadeia (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006) marcada pela disfunção

espermática (ZINI e LIBMAN, 2006; MARCHESI e FENG, 2007), a qual é oriunda dos danos gerados ao DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos (SIES, 1993; SANOCKA e KURPISZ, 2004). Tais elementos celulares representam os substratos moleculares mais frequentes das ROS (ORTEGA et al., 2003) e danos em suas estruturas resultam em ausência da competência dos espermatozoides para fertilização (CARVALHO et al., 2002; BAKER e AITKEN, 2005) e interrupção da integridade genética (BAKER e AITKEN, 2005), uma vez que os espermatozoides não possuem habilidade para reparar os danos sofridos (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006).

As fontes de ROS no sêmen são os espermatozoides, particularmente os imaturos (GIL-GUZMAN et al., 2001) e morfologicamente anormais, os leucócitos (AITKEN et al., 1995; SIKKA, 1996; AITKEN, 1997; SANOCKA e KURPISZ, 2004; ZINI e LIBMAN, 2006; MARCHESI e FENG, 2007) e os precursores de células germinativas (AGARWAL e SALEH, 2002). Entretanto, a formação dos oxidantes tem sido considerada uma propriedade inerente aos espermatozoides (AITKEN e CLARKSON, 1987), os quais possuem sistemas produtores de ROS na membrana plasmática pelo sistema NADPH-oxidase, e nas mitocôndrias pelo NADH-oxidorreductase dependente (AGARWAL e SALEH, 2002; GUERRA et al., 2004), representando a maior fonte intracelular de oxidante (BLAKE et al., 1987).

O balanço entre antioxidantes e oxidantes também pode ser interrompido em favor dos oxidantes (TURRENS, 2003), como consequência de baixas concentrações de antioxidantes no soro, plasma seminal e/ou meio diluidor (SIKKA, 2004) e do processamento do sêmen (centrifugação, criopreservação, descongelação), com destaque para as temperaturas de refrigeração, as quais conduzem a uma maior produção de ROS (SALEH e AGARWAL, 2002). Como consequência do desequilíbrio do sistema de defesa antioxidante, durante o processo de criopreservação, ocorre o estresse oxidativo (TURRENS, 2003) e a subsequente deterioração da qualidade e da função espermática (NOVOTNÝ et al., 2003).

No sêmen ovino criopreservado observa-se comprometimento da atividade e da distribuição dos antioxidantes enzimáticos presentes em seus espermatozoides, especialmente da superóxido dismutase (SOD) (MARTI et al., 2008). Neste contexto, o menor desempenho (WATSON, 2000) e a maior sensibilidade dos espermatozoides criopreservados ao estresse oxidativo, em relação aos diluídos *in natura* (PERIS et al., 2004; SILVA e GADELLA, 2006), podem ser justificados como resultantes da baixa capacidade antioxidante do sêmen (SHARMA et al., 1999).

Elevadas concentrações de ROS, provenientes de diferentes fontes, são responsáveis por induzir a peroxidação lipídica (STOJANOVIĆ et al., 2001; (SANOCKA e KURPISZ, 2004) e, a partir desta, a geração de danos às membranas plasmática e acrossomal, e à mitocôndria, com severas mudanças sobre o metabolismo celular (JONES e MANN, 1977a) e significativa redução da motilidade e vitalidade espermática (AITKEN et al., 2007). Em contrapartida, a extensão das injúrias induzidas pelo estresse oxidativo depende não apenas da natureza e da quantidade das ROS envolvidas, mas também do momento e da duração da exposição aos oxidantes e de fatores extracelulares como temperatura, tensão de oxigênio e composição do ambiente que envolve as células (SALEH e AGARWAL, 2002).

Todos os componentes celulares, incluindo lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares são alvos potenciais para o estresse oxidativo (SALEH e AGARWAL, 2002). Como consequência disso, observa-se que as elevadas concentrações de ROS e a baixa capacidade antioxidante total do sêmen estão diretamente relacionadas com a manifestação da infertilidade masculina (SHARMA et al., 1999), demonstrando a existência de uma correlação entre o escore de qualidade do sêmen e as concentrações de ROS (NALLELLA et al., 2005).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação consiste em uma reação em cadeia (STOJANOVIĆ et al., 2001) do tipo não enzimática de membrana ou enzimática dependente de NADPH e ADP (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004; SIKKA, 2004), que resulta na oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (ORTEGA et al., 2003). Esse tipo de reação pode ser catalisada por metais de transição, especialmente ferro e cobre (AITKEN et al., 2007), e comumente está dividida nas etapas de iniciação, propagação e terminação (BURCHAM, 1998), ganhando destaque na reprodução por determinar efeitos destrutivos mais severos sobre as membranas e o DNA (nuclear e mitocondrial) dos espermatozoides (SIKKA, 1996; COMHAIRE et al., 1999), o que resulta em perda de sua função (BURCHAM, 1998).

As membranas dos espermatozoides de mamíferos constituem o compartimento celular mais vulnerável à ação das ROS e à peroxidação lipídica (AITKEN, 1997; SIKKA, 2004), o que decorre de sua riqueza em ácidos graxos poli-insaturados. Assim, embora os lipídios de membrana sejam essenciais para a manutenção de sua fluidez (SANOCKA e KURPISZ, 2004; SIKKA, 2004) estes, representam o principal substrato da peroxidação (SANOCKA e KURPISZ, 2004), acarretando alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, com consequente perda da seletividade na troca

iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), determinando redução ou perda da motilidade (JONES e MANN, 1977b), viabilidade e fertilidade dos espermatozoides (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; ALVAREZ e MORAES, 2006).

As lesões de membrana, ocasionadas a partir da peroxidação dos ácidos graxos, localizam-se especialmente na região do acrossoma, uma vez que este é um dos compartimentos celulares mais sensíveis aos danos peroxidativos endógenos e exógenos (JONES e MANN, 1977a). Corroborando com esta descrição, o acrossoma de espermatozoides ovinos é, comprovadamente, mais sensível a peroxidação lipídica em virtude das elevadas concentrações do ácido docosahexanoico em sua estrutura, que corresponde ao substrato da lipoperoxidação em espermatozoides ovinos (JONES e MANN, 1977a).

Apesar da produção de ATP ser fundamental para a motilidade espermática (DONNELLY et al., 2000), é sabido que o sistema mitocondrial de geração de ROS é a maior fonte intracelular desses oxidantes (TURRENS, 2003), particularmente em espermatozoides de reprodutores inférteis (SALEH e AGARWAL, 2002). Por conseguinte, as ROS oriundas da cadeia respiratória da célula podem ocasionar danos oxidativos, com comprometimento do potencial de membrana mitocondrial (SANOCKA e KURPISZ, 2004) e da integridade do DNAm, o qual tem sido relacionado com o declínio da fertilidade e da motilidade espermática, podendo exercer importante papel na fisiopatologia dos espermatozoides de reprodutores inférteis ou subférteis (KAO et al., 1998).

2.5 Antioxidantes

Antioxidantes são compostos que regulam, removem e suprimem a formação de ROS ou contrariam suas ações (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006; SIKKA, 1996; SIKKA, 2004), evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). De modo geral, o mecanismo de defesa antioxidante é dividido nas etapas de prevenção, na qual é inibida a produção de ROS; de intercepção, que interrompe a reação em cadeia; e de reparação, a qual não é observada nos espermatozoides em virtude do carente sistema enzimático que possui em seu citoplasma, essencial para a execução dos reparos (SALEH e AGARWAL, 2002).

No sêmen, estão presentes antioxidantes intra e extracelulares que constituem os sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SANOCCA e KURPISZ, 2004), responsáveis pela proteção dos espermatozoides contra os insultos oxidativos (STOJANOVIĆ et al., 2001; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006; CHI et al., 2008). Esta proteção conferida pelos antioxidantes às células espermáticas é proveniente de vários caminhos, dentre os quais estão a remoção de radicais livres catalíticos, a varredura de ROS e a remoção de íons ferro e cobre (BLAKE et al., 1987).

Durante o período de maturação os espermatozoides perdem a maior parte de seu citoplasma e, com isso, são privados de uma fração dos antioxidantes endógenos, o que os torna vulneráveis à ação das ROS (CARVALHO et al., 2002). Deste modo, os espermatozoides maduros passam a depender, basicamente, da proteção dos antioxidantes presentes no plasma seminal (CARVALHO et al., 2002; ALVAREZ e MORAES, 2006) que se torna a mais importante forma de proteção utilizada pelos espermatozoides contra as ROS (SIKKA, 2004).

O plasma seminal é dotado de uma série de antioxidantes que protegem os espermatozoides contra agentes oxidativos (AITKEN et al., 1995; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006). Dentre estes estão as enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e sistema glutaciona peroxidase/glutaciona redutase (GSH-Px/GSH-Red) (CARVALHO et al., 2002; ZINI et al., 2002; ALVAREZ e MORAES, 2006) e antioxidantes não enzimáticos como α -tocoferol, ascorbato, urato, piruvato, glutaciona, taurina e hipotaurina que reduzem as concentrações de oxidantes no sêmen e mantêm a fertilidade natural e assistida mais adequada (AGARWAL e SALEH, 2002; SALEH e AGARWAL, 2002).

2.5.1 Terapia antioxidante

Durante o processamento do sêmen destinado ao armazenamento, o desequilíbrio entre a geração de ROS e a atividade antioxidante pode ser desencadeado tanto pelo comprometimento da capacidade protetora dos antioxidantes presentes no ejaculado, a partir da marcante redução de suas concentrações após diluição do sêmen (SARLÓS et al., 2002), quanto pelo estímulo à produção de ROS, durante a criopreservação (WATSON, 2000). Tal desequilíbrio, em favor dos oxidantes, resulta em efeitos tóxicos e comprometimento da funcionalidade celular (STORNELLI et al.,

2005), o que conduz frequentemente a apoptose, morte celular (TURRENS, 2003) e redução da fertilidade dos espermatozoides (PURDY, 2006a).

A fim de melhorar a qualidade do sêmen criopreservado (PERIS et al., 2004; JANG et al., 2006), por meio da prevenção ou redução do processo peroxidativo (KHERADMAND et al., 2006), diversos pesquisadores têm se dedicado a realizar estudos relacionados à adição de antioxidantes nos extensores seminais das diversas espécies, como é o caso da equina (MARQUES et al., 2002; SILVA et al., 2009) e da ovina (KHERADMAND et al., 2006). Neste contexto, podem ser destacados entre os antioxidantes já estudados com este fim a SOD, a GSH-Px, a GSH-Red (MARTI et al., 2008), a hipotaurina (LOPES et al., 1998), a vitamina E (SILVA et al., 2008), a vitamina C (KHERADMAND et al., 2006) e o resveratrol (SARLÓS et al., 2002).

Nessa linha de pesquisa, foi observado que os antioxidantes exógenos reduzem a concentração de malonaldeído (MDA) nas amostras seminais em decorrência da redução da peroxidação lipídica e, em virtude disto, são produzidos menos danos espermáticos e obtida melhor conservação do sêmen (SARLÓS et al., 2002). Entretanto, apesar de os antioxidantes ou agentes quelantes reduzirem as taxas de peroxidação dos fosfolípídeos endógenos dos espermatozoides (JONES e MANN, 1976), a terapia com antioxidantes pode apresentar efeitos indesejáveis se a dose de segurança for ultrapassada, devendo ser utilizado com moderação, até mesmo pelo fato de inibirem a formação das ROS e suas funções fisiológicas (CARVALHO et al., 2002).

2.5.2 Antioxidantes enzimáticos

Os antioxidantes enzimáticos são macromoléculas, oriundas ou não do próprio organismo, que protegem o mesmo contra as ROS e as RNS, podendo atuar diretamente sobre estes agentes ou reparar os danos por eles causados no organismo (BARREIROS et al., 2006). Em sistemas reprodutivos, é observado que as concentrações e o papel protetor destas enzimas antioxidantes diferem entre machos férteis e inférteis (KASIMANICKAM et al., 2006), o que sugere a existência de uma correlação positiva entre a ação antioxidante e a fertilidade.

- Superóxido dismutase (SOD)

Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD: a SOD-Cobre-Zinco, localizada principalmente no citosol, e a SOD-Mangânês, localizada principalmente na mitocôndria (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), que desempenham um papel chave no mecanismo de defesa celular contra a toxicidade do oxigênio e a lipoperoxidação (ABU-ERREISH et al., 1978; SIKKA, 1996). Tais ações protetoras decorrem da capacidade da SOD em catalisar a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 (Figura 2) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), os quais sofrem ação subsequente da GSH-Px e CAT (TURRENS, 2003), tendo sido demonstrado por Cerolini et al. (2001) que amostras de sêmen suíno apresentaram maior viabilidade após congelamento e descongelamento quando possuíam alta atividade de SOD e alta proporção de GSH-Px, antes da congelamento.

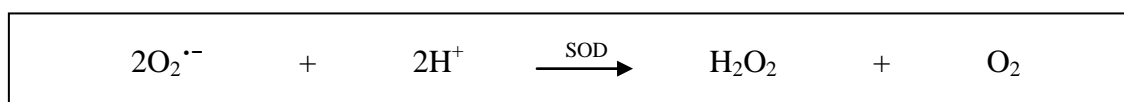


Figura 2 - Reação de dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2).

Fonte: Abu-Erreish et al. (1978).

- Catalase (CAT)

A catalase consiste em uma enzima antioxidante encontrada na região do peroxissoma e mitocôndria das células, a qual desempenha importante papel protetor contra os danos oxidativos (ABU-ERREISH et al., 1978), o que decorre de sua ação complementar a da SOD, convertendo o H_2O_2 produzido em O_2 e H_2O (Figura 3) (SIKKA, 1996; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006).

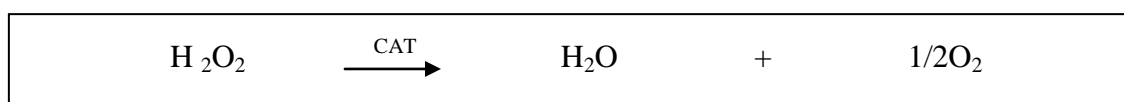


Figura 3 - Reação de dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio molecular (O_2) e água (H_2O).

Fonte: Maneesh e Jayalekshmi (2006).

- Sistema glutaciona peroxidase/glutaciona redutase (GSH-Px/GSH-Red)

A glutaciona peroxidase está presente no organismo dos mamíferos em quatro formas (GSH-Px 1, GSH-Px 2, GSH-Px 3 e GSH-Px 4), sendo a GSH-Px 4 responsável pela proteção dos espermatozoides (ALVAREZ e MORAES, 2006). Assim como a GSH-Red, a GSH-Px é um antioxidante enzimático envolvido na inibição da peroxidação lipídica (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006) e na proteção contra danos oxidativos (ABU-ERREISH et al., 1978), estando associada à inibição das ROS e a consequente manutenção da motilidade espermática (SIKKA, 2004). O efeito protetor da GSH-Px decorre de sua atuação como catalisador da redução/degradação do H_2O_2 e de outros peróxidos orgânicos (Figura 4) (SIKKA, 1996; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; ALVAREZ e MORAES, 2006), sendo a GSH-Px e a SOD descritas como responsáveis por desempenhar um importante papel como constituintes do sistema antioxidante que protege os espermatozoides de ovinos contra os efeitos tóxicos das ROS (KASIMANICKAM et al., 2006).

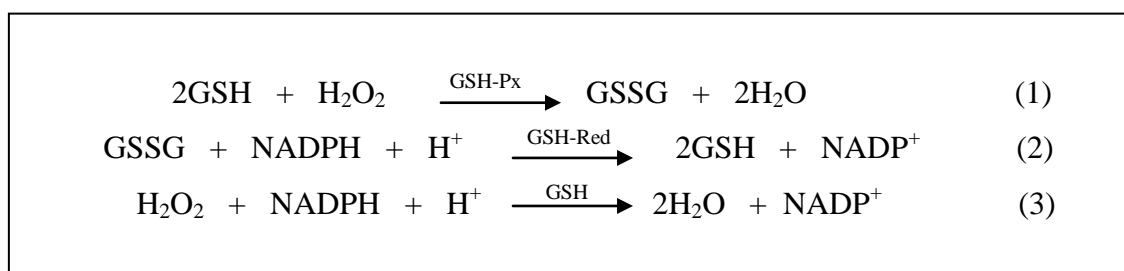


Figura 4 - Reação de redução do H_2O_2 a H_2O , na presença de GSH-Px (1) e reação de regeneração da GSH (glutaciona reduzida) e GSSG (glutaciona oxidada) na presença de GSH-Px e GSH-Red (2 e 3).

Fonte: Barreiros et al. (2006).

2.5.3 Antioxidantes não enzimáticos

Antioxidantes não enzimáticos são micromoléculas, oriundas ou não do próprio organismo, que têm por função protegê-lo das ações deletérias das ROS e RNS (BARREIROS et al., 2006).

- Vitamina E

A vitamina E é um antioxidante não enzimático (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006), lipossolúvel natural da membrana (SIKKA, 2004) que, assim como a vitamina C, pode proteger os espermatozoides contra danos oxidativos do DNA e da membrana (SIKKA, 1996). O efeito protetor deste antioxidante decorre de sua capacidade em prevenir a peroxidação lipídica e suprimir, por conseguinte, a produção de malonaldeído (AITKEN e CLARKSON, 1988), o que é possível pelo fato de atuar como quelante das ROS produzidas durante a lipoperoxidação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Em contrapartida, a vitamina E pode ter sua função comprometida em casos de elevada concentração de ferro (FERREIRA e MATSUBARA, 1997) e, quando em elevadas concentrações no interior da célula, pode ter efeitos adversos sobre os processos fisiológicos (SIKKA, 2004), uma vez que a atuação da vitamina E sofre interferência das condições de seu armazenamento, da composição lipídica das membranas e das concentrações de antioxidantes presentes no sêmen das diferentes espécies (BALL e VO, 2002).

Apesar desses relatos e dos variados resultados obtidos após adição da vitamina E para o armazenamento do sêmen, em estudo realizado por Kheradmand et al. (2006), esse antioxidante (α -Tocoferol acetato) determinou efeito protetor sobre a motilidade e a integridade de membrana de espermatozoides refrigerados (5 °C) de ovinos, após 48 horas.

- Vitamina C

O ácido ascórbico ou vitamina C é comumente encontrado no organismo na forma de ascorbato, constituindo um antioxidante de notável atuação *in vivo*, uma vez que neutraliza as ROS e RNS por meio de reações de redução e a partir disto, atua inibindo a peroxidação lipídica (BARREIROS et al., 2006). Esta inibição ocorre de forma direta ou indireta sobre as membranas celulares em meios aquosos e isto se deve ao fato deste antioxidante atuar eficientemente sobre ROS como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , hipoclorito (ClO^-), OH^{\bullet} e radical peroxil (OOH^{\bullet}) (VASCONCELOS et al., 2007). Em contrapartida, o ascorbato também pode atuar como pró-oxidante, o que ocorre quando presente em doses elevadas ou quando exposto a metais, fato que determina a

lipoperoxidação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), em virtude do estímulo à produção de H_2O_2 e OH^\bullet (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

- Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são divididos em dois grupos: o dos flavonoides e o dos não flavonoides (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Os denominados flavonoides apresentam a estrutura química C6-C3-C6, enquanto que os não flavonoides são classificados como sendo derivados das estruturas químicas C6-C1 (ácidos hidroxi bezoico, gálico e elágico), C6-C3 (ácidos cafêico e p-cumárico hidroxi cinamatos) e C6-C2-C6 (trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glucosídio) (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os compostos polifenólicos, em particular os flavonoides, possuem uma estrutura ideal para a retirada de radicais, o que decorre da presença de vários grupos hidroxila, tornando-os antioxidantes mais potentes do que as vitaminas C e E (BARREIROS et al., 2006). Deste modo, em virtude de suas propriedades de oxidorredução, os polifenóis podem desempenhar importante papel na absorção e na neutralização das ROS, exercendo efeito quelante sobre o oxigênio triplete e singlete ou decompondo os peróxidos (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004), que por sua vez, pode prevenir a ocorrência de danos espermáticos (SIKKA, 2004).

Em contrapartida, é importante destacar que cada flavonoide possui efeito biológico dependente de sua estrutura, dose e via de administração, fatores que podem determinar resultados variáveis após sua utilização (LIMA et al., 2001), justificando a não proteção das células e tecidos pelos compostos fenólicos, diante de todos os danos oxidativos sofridos (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Além disso, tais compostos podem apresentar atividade pró-oxidante, a exemplo do que ocorre com a quercetina ao reagir com o ferro (BIANCHI e ANTUNES, 1999), sendo tal atividade evidenciada, especialmente, em compostos que possuem potencial de oxidação menor que o do Fe^{3+} e do Cu^{2+} (BARREIROS et al., 2006).

a) Resveratrol

O resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiisstilbeno) é um polifenol (STOJANOVIĆ et al., 2001) não flavonoide (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004), encontrado sobre as

formas cis e trans (TRELA e WATERHOUSE, 1996). O cis-resveratrol é muito instável à ação da luz, enquanto que o trans-resveratrol consiste na forma mais estável, permanecendo por longo período quando protegido da luz e em uma faixa de pH entre 1 e 7 (TRELA e WATERHOUSE, 1996).

O trans-resveratrol (trans-3-5-4'-trihidroxiistilbeno) é abundantemente encontrado na videira e, embora não se conheça com clareza seu papel protetor, está entre os compostos fenólicos que inibem a formação de ROS, retardando o envelhecimento celular e orgânico (DAVID et al., 2007). Na presença de trans-resveratrol, a peroxidação lipídica é inibida mais eficazmente do que com as vitaminas C e E, sem prejuízos a este processo com o incremento da dose empregada, demonstrando que o resveratrol possui melhores efeitos antioxidantes do que tais vitaminas (STOJANOVIĆ et al., 2001).

Em experimento realizado por Sarlós et al. (2002), foi verificado que o resveratrol, composto previamente não empregado para a conservação do sêmen, é um antioxidante altamente potente, inibindo a peroxidação lipídica com maior eficácia em baixas concentrações ($15 \mu\text{g}/10^9$ espermatozoides/1 mL) nas temperaturas de 37 e 5 °C. Os efeitos benéficos do trans-resveratrol sobre a reprodução também foram evidenciados em estudo realizado por Juan et al. (2005), que, ao trabalharem com a administração oral deste composto (20 mg/kg/dia; 90 dias) em ratos, constataram o aumento da produção espermática e a não manifestação de efeitos adversos sobre estas células, em decorrência da ausência de toxicidade do resveratrol. Por outro lado, Kyselova et al. (2003) demonstraram que a administração oral de resveratrol (3 mg/L; 28 dias) em ratos, não interferiu na qualidade espermática, assim como na espermatogênese e na fertilidade dos espermatozoides.

b) Quercetina

A quercetina é um polifenol flavonoide (STOJANOVIĆ et al., 2001) que tem sido testado para o tratamento de elevadas concentrações de colesterol e de doenças cardiovasculares (LIMA et al., 2001), por sua capacidade adstringente (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). Este flavonoide possui efeito inibidor da peroxidação lipídica similar e sinérgico ao do resveratrol, sendo, portanto, um antioxidante mais potente que as vitaminas C e E (STOJANOVIĆ et al., 2001), em virtude da grande quantidade de grupos hidroxila em sua estrutura (BARREIROS et al., 2006). Além

disso, a quercetina possui comprovada capacidade inibidora de danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 no DNA de linfócitos humanos (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

2.6 Testes Laboratoriais para a Avaliação Espermática

A meta primária das análises de sêmen é a determinação *in vitro* da capacidade fertilizante dos espermatozoides (LUZ et al., 2000; GRAHAM, 2001; VALENÇA e GUERRA, 2007) e, conseqüentemente, da fertilidade de um reprodutor (ZINI e LIBMAN, 2006), sendo a realização das mesmas de fundamental importância para as amostras de sêmen submetidas à criopreservação (FOOTE, 2002). Em contrapartida, as análises de rotina (volume seminal, motilidade espermática, densidade, viabilidade e morfologia) não fornecem um diagnóstico completo, de modo que indivíduos podem permanecer inférteis mesmo apresentando tais parâmetros seminais normais após avaliação (SIKKA, 1996).

Os pesquisadores têm se empenhado em desenvolver exames laboratoriais para a predição acurada da fertilidade dos espermatozoides, embora esta não seja uma tarefa de fácil execução, uma vez que para a fertilização do oócito, os gametas masculinos devem ter uma série de atributos (ARRUDA et al., 2007). Como consequência disto, nenhum teste laboratorial em isolado pode estimar o potencial de fertilidade dos espermatozoides (ARRUDA et al., 2007), de modo que a melhor predição da qualidade de uma amostra seminal e do potencial fertilizante masculino é oriunda da realização conjunta de diferentes técnicas de avaliação (PERIS et al., 2004).

Buscando atender aos princípios básicos das análises laboratoriais (objetividade, repetitividade, rapidez na execução e baixo custo) (GRAHAM, 2001), várias metodologias têm sido utilizadas, dentre as quais se destacam as análises fluorescentes e as análises computadorizadas (ARRUDA et al., 2007). A utilização dos corantes fluorescentes para a avaliação dos espermatozoides se destaca por refletir o real estado das estruturas celulares, apresentando alta repetibilidade (CELEGHINI et al., 2007) e possibilidade de utilização em isolado ou em combinação para a determinação da integridade e da viabilidade celular (ARRUDA et al., 2007). Por sua vez, os sistemas de análises computadorizadas de imagens apresentam alta repetibilidade das avaliações, sendo mais precisos, acurados e objetivos, com destaque para a citometria de fluxo que

permite a avaliação de milhares de células por segundo e pode ser usada em associação aos fluorocromos (ARRUDA et al., 2007).

2.6.1 Avaliação da integridade de membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática é avaliada usualmente após coloração das células com corantes impermeáveis a membranas íntegras, dentre os quais estão o Hoechst 33258, YoPro-1, iodeto de propídeo (IP), brometo de etídeo-1, ToPro-3 e TOTO. Um caminho alternativo para a avaliação desta estrutura são os corantes permeáveis, tais como diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e SYBR®-14, os quais podem ser empregados isolados ou em associação aos corantes impermeáveis (SILVA e GADELLA, 2006), a fim de permitir a diferenciação entre células lesadas e intactas (AURICH, 2005).

O DCF é uma sonda permeável à célula intacta que sofre metabolização por esterases em seu interior e, a partir disto, é convertido em carboxifluoresceína fluorescente verde, impermeável à membrana plasmática (AURICH, 2005; SILVA e GADELLA, 2006). Em contrapartida, o SYBR®-14 e o IP são corantes específicos de DNA, sendo responsáveis pela coloração das células vivas em verde fluorescente e das células mortas em vermelho fluorescente, respectivamente (AURICH, 2005; SINGH, 2006).

2.6.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O primeiro sinal de estresse induzido pelo aumento da concentração de ROS é a interrupção do potencial de membrana mitocondrial, tendo sido a mensuração deste parâmetro utilizada para predizer o risco dos espermatozoides sofrerem apoptose (MARCHESI e FENG, 2007). Desse modo, corantes como o Rhodamine 123 (GRAHAM, 2001; AURICH, 2005) e o 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianine iodide (JC-1), podem ser utilizados para o monitoramento do potencial de membrana mitocondrial (AURICH, 2005; YAO et al., 2008).

O corante Rhodamine 123 é usado para avaliação da função mitocondrial dos espermatozoides (GRAHAM, 2001) pelo fato de ser um corante seletivo de membranas funcionais, cujo princípio de atuação está baseado na formação do gradiente de próton

na membrana mitocondrial interna (SILVA e GADELLA, 2006). Neste contexto, o corante fluorescente é transportado e acumulado no interior das mitocôndrias com respiração ativa (mitocôndrias funcionais), emitindo fluorescência verde (GRAHAM, 2001) após sua ligação à membrana mitocondrial interna (HOLT, 2000a), não permitindo, porém, diferenciar mitocôndrias com diferentes taxas respiratórias (GRAHAM, 2001).

O JC-1 é uma sonda fluorescente utilizada para avaliação da funcionalidade mitocondrial (ARRUDA et al., 2007), cujo princípio de atuação se baseia nas mudanças de polarização da membrana mitocondrial interna (SILVA e GADELLA, 2006). Por ser dependente do gradiente eletroquímico, este corante necessita de potencial de membrana mitocondrial altamente negativa para penetrar na organela e emitir fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha ou verde, de acordo com sua concentração interna final. Em concentrações elevadas, o corante apresenta-se na forma de J-conjugado e emite coloração vermelha caracterizando mitocôndrias funcionais, enquanto que em concentrações baixas encontra-se na forma de monômero e emite coloração verde, inerente a mitocôndrias afuncionais (ARRUDA et al., 2007).

2.6.3 Acrossoma

A integridade do acrossoma é comumente avaliada por meio das lecitinas conjugadas fluorescentes, as quais interagem com glicoconjugados exclusivamente localizados no acrossoma ou com a matriz acrossomal (HOLT, 2000a; SILVA e GADELLA, 2006; ARRUDA et al., 2007). Dentre as lecitinas conjugadas estão *Pisum sativum agglutinin* (PSA) e *Arachis hypogaea agglutinin* (PNA), sendo normalmente utilizados para este tipo de análise o FITC-PNA, TRITC-PNA e RPE-PNA (SILVA e GADELLA, 2006).

Quando o PSA é usado para a avaliação do acrossoma, os espermatozoides que possuem integridade acrossomal não são corados, uma vez que, neste caso, o contato da sonda fluorescente com o conteúdo acrossomal, ao qual se liga, é evitado. Por outro lado, em células que apresentam acrossomas danificados, o PSA entra em contato com o conteúdo acrossomal e se liga a α -manose e a α -galactose da matriz acrossomal, corando esta região (GRAHAM, 2001) em verde amarelado fluorescente (ARRUDA et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007).

Em contrapartida, quando é usado o PNA para a avaliação da integridade do acrossoma, este corante se liga a β -galactose associada à pequena porção da membrana acrossomal externa (GRAHAM, 2001) de espermatozoides portadores de acrossoma intacto, corando-os com uma fluorescência verde brilhante. Por outro lado, em acrossomas reagidos e onde existem áreas lesionadas na membrana acrossomal, o corante não consegue se ligar a β -galactose nas áreas comprometidas, apresentando-se corados em verde fluorescente apenas na região equatorial da cabeça espermática ou não cora em toda a extensão da cabeça (ROTH et al. 1998).

2.6.4 Peroxidação lipídica

Os métodos comumente utilizados para a mensuração das ROS são baseados no uso dos complexos Nitroblue Tetrazolium (NBT) ou citocromo C-Fe³⁺ e do corante fluorescente luminol (SIKKA, 1996; SIKKA, 2004; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006), que consistem em testes de mensuração direta (GUERRA et al., 2004). Para a mensuração indireta, são utilizados testes para determinação das concentrações de antioxidantes e de lipoperoxidação (GUERRA et al., 2004), que pode ser obtida através da dosagem dos produtos da peroxidação, tal como o malonaldeído (MDA) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; CHI et al., 2008) e por corantes fluorescentes como o C11 BODIPY581/591 (AITKEN et al., 2007; ARRUDA et al., 2007).

O nitroblue tetrazolium (NBT) é usado para determinar a quantidade de ROS produzida pela célula, particularmente na superfície das membranas celulares (SIKKA, 1996; SIKKA, 2004; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006), e se baseia na redução de sua estrutura na presença de ROS com a ocorrência de depósito de formazanas, compostos insolúveis em água de cor preta azulada (SALEH e AGARWAL, 2002).

O luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazinedione) é um corante quimioluminescente (SANOCKA e KURPISZ, 2004) fluorescente que reage com uma variedade de ROS (H₂O₂, O₂⁻, OH⁻, ¹O₂) (AITKEN e CLARKSON, 1987) em pH neutro, produzindo a partir desta reação um sinal luminoso que é observado no luminômetro (SALEH e AGARWAL, 2002), e que se traduz na quantificação das ROS (SIKKA, 1996). Com a utilização do luminol (SANOCKA e KURPISZ, 2004), é possível quantificar as ROS produzidas tanto no interior quanto no exterior da célula (SIKKA, 1996; SIKKA, 2004; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006). Por outro lado, embora esta metodologia seja a mais comumente utilizada para quantificação das taxas

de geração de ROS, ela pode não refletir precisamente o status de danos espermáticos provocados pelos oxidantes (SIKKA, 2004; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006).

A lipoperoxidação de membranas é habitualmente monitorada pelo método de dosagem do MDA (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), cuja concentração pode ser determinada a partir da utilização de testes comerciais, como é o caso do MDA-586 (CHI et al., 2008). Neste caso, após processamento, as amostras são submetidas à espectrofotometria para a determinação da concentração de MDA (CHI et al., 2008).

A peroxidação lipídica pode ser observada, quantificada e localizada de forma mais precisa após marcação pelo corante C11 BODIPY581/591, o qual consiste em um análogo fluorescente dos ácidos graxos insaturados, principais alvos das ROS (SILVA e GADELLA, 2006; ARRUDA et al., 2007). Deste modo, após sofrer peroxidação, o C11 BODIPY muda suas propriedades fluorescentes, passando da cor vermelha original da sonda intacta para a cor verde quando peroxidada pelas ROS, e para laranja quando peroxidada por RNS (SILVA e GADELLA, 2006). Esta técnica é muito eficaz para o monitoramento da peroxidação lipídica em populações de espermatozoides de mamíferos, visto que detecta níveis de lipoperoxidação com grau elevado de correlação da produção de ROS nos espermatozoides (AITKEN et al., 2007).

2.6.5 Capacitação

O estado de capacitação espermática comumente é avaliado por meio do antibiótico fluorescente clortetraciclina (CTC), que se liga à membrana plasmática na dependência dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} , embora possa ser utilizado, alternativamente, o corante hidrofóbico Merocyanine 540 (M540), que age independente do Ca^{2+} (SILVA e GADELLA, 2006). A realização desse tipo de teste é de suma importância, especialmente, para a avaliação de amostras de sêmen criopreservadas, em virtude do processo de criocapacitação espermática (HOLT, 2000a).

2.6.6 Associação de sondas

A incapacidade de fertilizar dos espermatozoides pode ser proveniente de diversos fatores e, em virtude disso, é justificável a mensuração de múltiplos parâmetros espermáticos simultaneamente, o que permite a predição mais eficaz da capacidade fertilizante dessas células (GRAHAM, 2001). Neste contexto, as associações de sondas

fluorescentes permitem avaliar, concomitantemente, mais de um compartimento da mesma célula espermática (ARRUDA et al., 2007), o que geralmente é realizado para a análise de estruturas da membrana plasmática e acrossomal e do potencial da membrana mitocondrial (ARRUDA et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-ERREISH, G.; MAGNES, L.; LI, T.-K. Isolation and properties of superoxide dismutase from ram spermatozoa and erythrocytes. **Biology of Reproduction**, v. 18, p. 554-560, 1978.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinics of North America**, v. 29, n. 4, p.1-12, 2002.
- AITKEN, R.J.; WINGATE, J.K.; IULIIS, G.N.D.; McLAUGHLIN, E.A. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 203-211, 2007.
- AITKEN, R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 169-173, 1997.
- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; BRINDLE, J.; GOMEZ, E.; BAKER, H.W.G.; IRVINE, D.S. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. **Human Reproduction**, v. 10, n. 8, p. 2061-2071, 1995.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of Andrology**, v. 6, n. 6, p. 367-376, 1988.
- 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. 459-469, 1987.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 105-113, 2005.
- ALVAREZ, C.A.; MORAES, G.V. Efeitos da Selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. *Revista de Saúde e Biologia*, v.1, n. 1, p. 42-51, 2006.
- ARO, D.T.; POLIZER, K.A.; PENA, S.B. O agronegócio na ovinocultura de corte no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano V, n. 9, 2007.
- ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.

- ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K.; FULLER, B.J. **Temperature and Animal Cells.**, Cambridge: Biologists Ltda, p. 395-406, 1987.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stores stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.
- ÁVILA-PORTILLO, L.M.; MADERO, J.I.; LÓPEZ, C.; LEÓN, M.F.; ACOSTA, L.; GÓMEZ, C.; DELGADO, L.G.; GÓMEZ, C.; LOZANO, J.M.; REGUERO, M.T. Fundamentos de criopreservación. **Revista Colombiana de Obstetrícia y Ginecología**, v. 57, n. 4, p. 291-300, 2006.
- BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. Regulation of internal Ca^{2+} by chilled bull and boar spermatozoa. **Cryobiology**, v. 32, p. 259-269, 1995.
- BAKER, M.A.; AITKEN, R.J. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 67-75, 2005.
- BALL, B.B.; VO, A.T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v.23, p. 259-269, 2002.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BAUMBER, J; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 4, n. 4, p. 621-628, 2003.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO, A.L.; SANTOS, A.D.F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R.B.S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A.P.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, J.D. Utilização de glicerol e etileno glicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.

- BLAKE, D.R.; ALLEN, R.E.; LUNEC, J. Free radicals in biological systems – a review orientated to inflammatory processes. **British Medical Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 371-385, 1987.
- BRANDÃO, A.C.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; MARTINS, J.F.P.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.D'Á.; VISINTIN, J.A. Influência do glicerol e etilenoglicol e da criopreservação sobre o complexo DNA-Proteína de espermatozoides em garanhões. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 68-73, 2006.
- BRISOLA, L.B.S.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; MONTAGNER, M.M. Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados com etileno glicol. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 527-531, 1999.
- BURCHAM, P.C. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. **Mutagenesis**, v. 13, n. 3, p. 287-305, 1998.
- CALDERAM, I.B.K.; MASCHIO, É.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; RAMBO, G.; CORRÊA, É.K.; LUCIA Jr, T.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1978-1983, 2008.
- CANISSO, I.F.; SOUZA, F.A.; ESCOBAR, J.M.O.; CARVALHO, G.R.; MOREL, M.C.D.; SILVA, E.C.; GUIMARÃES, J.D.; LIMA, A.L. Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*). **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 19, n. 2, p. 113-125, 2008.
- CARNEIRO, G.F. Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 268-273, 2007.
- CARVALHO, D.M.; SOUZA, J.P. Análise da cadeia produtiva da caprino-ovinocultura em Garanhuns. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, n. 46, 2008, Rio Branco. **Anais...Rio Branco: SOBER**, 2008, CDROOM.
- CARVALHO, O.F.; 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, n.1, p. 33-38, 2002.

- CASTRO, A.C.N.; PACHECO, A.; SILVA, D.B.; GONDIM, D.S.; PINHO, T.G. Viabilidade do sêmen canino submetido a criopreservação com glicerol e etileno-glicol. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 122-124, 2007.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ALBUQUERQUE, R.; SILVA, F.H.A.; FARIA, D.E.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes of rooster spermatozoa. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 3, p. 143-149, 2007.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v. 121, p. 395-401, 2001.
- CHI, H.J.; KIM, J.H.; RYU, C.S.; LEE, J.Y.; PARK, J.S.; CHUNG, D.Y.; CHOI, S.Y.; KIM, M.H.; CHUN, E.K.; ROH, S.I. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 23, n. 5, p. 1023-1028, 2008.
- COLAS, G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 42, p. 277-285, 1975.
- COMHAIRE, F.H.; MAHMOUD, A.M.A.; DEPUYDT, C.E.; ZALATA, A.A.; CHRISTOPHE, A.B. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 5, p. 393-398, 1999.
- CURRY, M.R.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 1014-1021, 1994.
- DAVID, J.M.P.; DAVID, J.P.; SANTOS, V.L.C.S.; SANTOS, M.L.S.; MOTA, M.D. Resveratrol: Ações e benefícios à saúde humana. **Diálogos e Ciência**, ano V, n. 10, p. 1-11, 2007.
- DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DONNELLY, E.T.; O'CONNELL, M.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, n. 7, p. 1552-1561, 2000.

ESTEVEZ, S.C.; SHARMA, R.K.; THOMAS Jr, A.J.; AGARWAL, A. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. **Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 2173-2179, 2000.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; De ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O.P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, J.S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v. 53, p. 81-89, 2007.

FIGUEIRÊDO, E.L.; NUNES, J.F.; CORDEIRO, M.A.; SOUZA, P.T.; DIÓGENES FILHO, R.N.; VIEIRA, V.E.; SILVA FILHO, A.H.S.; MESQUITA, F.L.T.; SALGUEIRO, C.C.M.; FEITOSA, J.V. Inseminação artificial de ovelhas da raça Santa Inês com sêmen diluído em água de coco *in natura* e em pó. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 95-97, 2007.

FOOTE, R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. **Journal of Animal Science**, v. 80, p.1-10, 2002.

FRASER, L.; GORSZCZARUK, K.; STRZEZEK, J. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolarity. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 36, p. 325-329, 2001.

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

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 399-404, 1999.

- GIL-GUZMAN, E.; OLLERO, M.; LOPEZ, M.C.; SHARMA, R.K.; ALVAREZ, J.G.; THOMAS Jr, A.J.; AGARWAL, A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1922-1930, 2001.
- GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247, 2001.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.
- HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7^a ed. Barueri: Editora Manole, 2004. 513p.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000a.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000b.
- HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1086-1094, 1992.
- JANG, H.-Y.; KIM, S.-G.; KIM, J.-T.; PARK, C.-K.; CHEONG, H.-T.; LEE, H.-K.; YANG, B.-K.. Effects of antioxidants on sperm motility during in vitro storage of boar semen. **Korean Journal Gerontology**, v. 16, n. 6, p. 47-51, 2006.
- JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-268, 1977a.
- JONES, R.; MANN, T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 255-260, 1977b.
- JONES, R.; MANN, T. Lipid peroxidation in spermatozoa; formation, role of plasmalogen, and physiological significance. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 193, n. 1113, p. 317-333, 1976.
- JUAN, M.E.; GONZÁLEZ-PONS, E.; MUNUERA, T.; BALLESTER, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; PLANAS, J.M. Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. **The Journal of Nutrition**, v. 135, p. 757-760, 2005.

- JULIANI, G.C.; HENRY, M. Efeito do glicerol, etilenoglicol, acetamida e leite desnatado na criopreservação de espermatozoides eqüinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1103-1109, 2008.
- KASIMANICKAM, R.; PELZER, K.D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W.S.; THATCHER, C.D. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, v. 65, p. 1407-1421, 2006.
- KAO, S-H.; CHAO, H-T.; WEI, Y-H. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 7, p. 657-666, 1998.
- KASHIWAZAKI, N.; OKUDA, Y; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 4, p. 511-516, 2006.
- KHERADMAND, A.; BABAEI, H.; ABSHNAS, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 7, n. 4, p. 40-45, 2006.
- KYSELOVA, V.; PEKNICOVA, J.; BUCKIOVA, D.; BOUBELIK, M. Effects of p-nylonphenol and resveratrol on body and organ weight and *in vivo* fertility of outbred CD-1 mice. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 30-39, 2003.
- LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v. 165, p. 1-10, 1998.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.
- LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGHETA, P.C.; TINOCO, A.L.A.; SILVA, J.F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.
- LOPES, S.; JURISICOVA, A.; SUN, J-G.; CASPER, R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 896-900, 1998.

- LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 2, p. 10-18, 2000.
- MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 80-89, 2006.
- MANTOVANI, R.; ROTA, A.; FALOMO, M.E.; BAILONI, L.; VINCENTI, L. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 217–226, 2002.
- MARCHESI, D.E.; FENG, H.L. Sperm DNA integrity from sperm to egg. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 4, p. 481-489, 2007.
- MARQUES, A.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; GOBESSO, A.A.O.; NEVES NETO, J.R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to *in vitro* incubation. **Theriogenology**, v.58, p.257-260, 2002.
- MARTI, E.; MARTI, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 4, p. 459-467, 2008.
- MELO, C.M.; ZAHN, F.S.; MARTIN, I.; ORLAND, C.; DELL'AQUA Jr, J.A.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 4, p.171-175, 2007.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5ª ed. Porto Alegre: Livraria Sulina Editora, 1982. 783 p.
- MOLINIA, F.C.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. *In vitro* evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. **Reproduction Nutrition Development**, v. 34, p. 491-500, 1994.
- MORAES, C.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; SCHWEITZER, C.M. Criopreservação do sêmen ovino em *pellets* com etileno glicol. **Ciência Rural**, v. 28, n. 2, p. 287-292, 1998.
- MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Effects of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p.285-291, 2004.

- NALLELLA, K. P.; SHARMA, R. K.; ALLAMANENI, S. S. R.; AGARWAL, A. Identification of male factor infertility using a novel semen quality score and reactive oxygen species levels. **Clinics**, v. 60, n. 4, p. 317-324, 2005.
- NALBANDOV, A.V. **Reproductive physiology of mammals and birds**. 3^a ed. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1976. 334p.
- NOVOTNÝ, J.; OBORNÁ, I.; BŘEZINOVÁ, J.; SVOBODOVÁ, M.; HRBÁČ, J.; FINGEROVÁ, H. The occurrence of reactive oxygen species in the semen of males from infertile couples. **Biomedical Papers**, v. 147, n. 2, p. 173-176, 2003.
- O'CONNELL, M.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 704-709, 2002.
- OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T.; KAMIJO, S.; KASHIWAZAKI, N. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. **Experimental Animals**, v. 56, n. 1, p. 29-34, 2007.
- OLIVEIRA, E.C.S.; JULIANI, G.C.; MARQUES Jr, A.P.; HENRY, M. *In vitro* evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1116-1122, 2006.
- ORTEGA, A.M.; IZQUIERDO, A.C.; GÓMEZ, J.J.H.; OLIVARES-CORICHI, I.M.; TORRES, V.M.M.; MÉNDEZ, J.J.V. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. **Interciencia**, v. 28, n. 12, p. 699-704, 2003.
- PAASCH, U.; SHARMA, R.K.; GUPTA, A.K.; GRUNEWALD, S.; MASCHA, E.J.; THOMAS, A.J.; GLANDER, H.-J.; AGARWAL, A. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1828-1837, 2004.
- PENÁ, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTINEZ, H.R. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85-98, 2003.
- PERIS, S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 2, p. 224-233, 2004.

- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability and cryopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597-612, 2006.
- POLGE, C. Current status of the preservation of semen and embryos. **Proceeding of the Royal Society of Medicine**, v. 69, n. 8, p. 560-562, 1976.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006a.
- PURDY, P. H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5 °C prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 114-123, 2006b.
- QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 403-407, 1980.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M. BUSH, L.M.; 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.
- RUIZ, L.; SANTIANI, A.; SANDOVAL, R.; HUANCA, W.; DELGADO, A.; CORONADO, L.; ALZAMORA, C. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 18, n. 2, p. 99-106, 2007.
- RUIZ-PESINI, E.; DIEZ, C.; LAPEÑA, A.C.; PÉREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J.; ALVAREZ, E.; ARENAS, J.; LÓPEZ-PÉREZ, M.J. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 1616-1620, 1998.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.
- SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 12-18, 2004.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, G.; 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.

SETCHELL, B.P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. **Reproduction in mammals: Germ cells and fertilization**. 2^a ed. Cambridge: Cambridge University Press, v. 1, p. 63-101, 1993.

SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.R.; THOMAS Jr, A.J.; 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, n. 11, p. 2801-2807, 1999.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

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

SIKKA, S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v.1, p. 78-86, 1996.

SINGH, B.K. **Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda**. São Paulo: Andrei Editora LTDA, 2006, 331 p.

SILVA, K.M.G.; MORAES, T.A.P.; SILVA, 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 descongelação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 42-49, 2009.

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

SILVA, A.F.; COSTA, E.P.; OLIVEIRA, F.A.; TORRES, C.A.A.; HASS, G.T.S.; NASCIMENTO, V.A. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 452-456, 2006.

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

SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 56-64, 2007.

- SOARES, M.P.; ROSSI, C.A.R.; MEZZALIRA, A.; CECIM, M. Etileno glicol na criopreservação de sêmen canino. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 649- 655, 2002.
- SOUZA, A.F., GUERRA, M.M.P., BATISTA, A.M., MERGULHÃO, F.C.C., NEVES, A.C., WISCHRAL, A. Congelamento de sêmen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl. 5, p. 103-105, 2002.
- SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1056-1065, 2004.
- STOJANOVIĆ, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 79-89, 2001.
- STORNELLI, M.C.; TITTARELLI, C.M.; SAVIGNONE, C.A.; STORNELLI, M.A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinaria**, v. 25, n. 2, p. 28-35, 2005.
- TASSERON, F.; AMIR, D.; SCHINDLER, H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p.461-462, 1977.
- TRELA, B.C.; WATERHOUSE, A.L. Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1253-1257, 1996.
- TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v.552, n. 2, p. 335-344, 2003.
- VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VIANA, J.G.A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Ano 4, n. 12, p. 44-47, 2008.

YAO, J.; JIANG, Z.; DUAN, W.; HUANG, J.; ZHANG, L.; HU, L.; HE, L.; LI, F.; XIAO, Y.; SHU, B.; LIU, C. Involvement of mitochondrial pathway in triptolide-induced cytotoxicity in human normal liver L-02 cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 592-597, 2008.

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

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.

ZINI, A.; LIBMAN, J. Sperm DNA damage: Clinical significance in the era of assisted reproduction. **Canadian Medical Association Journal**, v. 175, n. 5, p. 494-500, 2006.

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

4 EXPERIMENTOS

4.1 Efeito da adição dos crioprotetores glicerol, etileno glicol e acetamida na viabilidade *in vitro* de espermatozoides congelados de ovinos

Effect of glycerol, ethylene glycol and acetamide cryoprotectants addition on in vitro viability of thawed ram spermatozoa

**Ellen Cordeiro Bento da Silva, Jobson Felipe de Paula Cajueiro,
Sildivane Valcácia Silva, Maria Madalena Pessoa Guerra**

Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária da
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE

RESUMO

Objetivando-se avaliar o efeito de diferentes concentrações dos crioprotetores glicerol, etileno glicol e acetamida na viabilidade *in vitro* de espermatozoides congelados de ovinos, foram utilizados quatro reprodutores adultos, mestiços da raça Santa Inês. Após colheita com vagina artificial, alíquotas de sêmen foram avaliadas macroscópica e microscopicamente. A seguir, procedeu-se à formação do *pool* de sêmen, avaliação, diluição em Tris-gema acrescido de glicerol (G1 = 5%), etileno glicol (G2 = 3%; G3 = 5%) ou acetamida (G4 = 2%; G5 = 7%), envase em palhetas (0,25 mL), congelação e armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C). As amostras descongeladas (37 °C/30 segundos) foram avaliadas quanto a motilidade progressiva (MP), vigor, integridade de membrana plasmática (iMP), potencial de membrana mitocondrial (PMM) e integridade do acrossoma (iAC). Constatou-se que a MP das amostras congeladas com glicerol a 5% (G1) foi superior ($P < 0,05$) a do etileno glicol a 5% (G3), assim como da acetamida a 2% (G4) e 7% (G5), e que o vigor não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre as amostras do glicerol a 5% (G1) e etileno glicol a 3% (G2) e 5% (G3), os quais foram superiores ($P < 0,05$) àquelas da acetamida a 2% (G4) e a 7% (G5). Os espermatozoides congelados com glicerol a 5% (G1) apresentaram maior ($P < 0,05$) percentual de iMP do que aqueles com etilenoglicol a 3% (G2) e a 5% (G3), assim como com acetamida a 2% (G4) e a 7% (G5). As amostras congeladas com etileno glicol a 3% (G2) e a 5% (G3) apresentaram mais células ($P < 0,05$) com iMP do que as com acetamida a 2% (G4) e a 7% (G5). Os parâmetros de PMM e iAC não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos. Conclui-se que o glicerol (5%) é mais eficaz na proteção dos espermatozoides ovinos submetidos aos efeitos deletérios da congelação do que o etileno glicol (3 e 5%) e a acetamida (2 e 7%).

Palavras chave: Congelação, crioprotetores, ovino, sêmen.

ABSTRACT

Aiming to evaluate the effect of different concentrations of glycerol, ethylene glycol and acetamide cryoprotectors on *in vitro* viability of ram frozen spermatozoa, were used four mature Santa Inês crossbred males. After collect with artificial vagina, aliquots of semen were evaluated macroscopic and microscopically. Then proceeded the pool of semen formation, evaluation, dilution in Tris-yolk egg plus glycerol (G1 = 5%), ethylene glycol (G2 = 3%; G3 = 5%) or acetamide (G4 = 2%; G5 = 7%), packed in straws (0.25 mL), freezing and storage in liquid nitrogen (-196 °C). Thawed samples (37 °C/30 seconds) were evaluated for progressive motility (PM), vigor, plasma membrane integrity (PMi), mitochondrial membrane potential (MMP) and acrosome integrity (ACi). It was found that the PM of frozen samples with glycerol 5% (G1) was higher ($P < 0.05$) than those with ethylene glycol 5% (G3), as well as acetamide 2% (G4) and 7% (G5), and that the vigor didn't have significantly different ($P > 0.05$) among samples of glycerol 5% (G1), ethylene glycol 3% (G2) and 5% (G3), which were higher ($P < 0.05$) than those with acetamide 2% (G4) and 7% (G5). Sperm frozen with glycerol 5% (G1) had higher ($P < 0.05$) percentage of PMi than those with ethylene glycol 3% (G2) and 5% (G3), and acetamide 2% (G4) and 7% (G5). Samples frozen with ethylene glycol 3% (G2) and 5% (G3) had more cells ($P < 0.05$) with PMi than those with acetamide 2% (G4) and 7% (G5). The PMM and ACi parameters didn't show significantly difference ($P > 0.05$) among treatments. It can be concluded that glycerol (5%) is more effective in protecting ram spermatozoa subjected to deleterious effects of freezing than ethylene glycol (3 and 5%) and acetamide (2 and 7%).

Keywords: Freezing, cryoprotectants, ram, semen.

INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen visa prolongar a longevidade dos espermatozoides pela redução de sua atividade metabólica (FICKEL et al., 2007), maximizando o uso dos animais de alto potencial genético, preservando o material genético de animais que estão permanente ou temporariamente inábeis a reprodução e possibilitando o transporte do sêmen a longas distâncias (MELO et al., 2007).

Embora esta biotécnica do sêmen beneficie os avanços na criação de animais de interesse zootécnico (WATSON, 2000), as temperaturas usadas para congelação e descongelação ocasionam redução da motilidade espermática e danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais a estas células (SALAMON e MAXWELL, 1995), determinando baixos índices de fertilização após inseminação artificial (IA) (BRISOLA et al., 1999; PERIS et al., 2004).

Visando minimizar o estresse físico e químico resultante da refrigeração, congelação e descongelação das células espermáticas, os crioprotetores espermáticos

são adicionados ao meio de congelação, os quais são classificados como penetrantes e não penetrantes na célula. Muitos crioprotetores penetrantes e suas combinações têm sido testados para a criopreservação espermática (PURDY, 2006), a fim de encontrar uma alternativa que diminua a toxicidade do glicerol (OKUDA et al., 2007). Apesar de serem responsáveis pela redução do estresse osmótico e da formação de gelo intracelular (FICKEL et al., 2007), a concentração final de um crioprotetor penetrante varia em decorrência da relação entre sua toxicidade e seus efeitos benéficos aos espermatozoides (PURDY, 2006).

O glicerol é o crioprotetor penetrante mais utilizado para a congelação de espermatozoides ovinos (SALAMON e MAXWELL, 2000). Todavia, este crioprotetor determina danos osmóticos aos espermatozoides, os quais dependem de fatores relacionados à espécie (ALVARENGA et al., 2005; PURDY, 2006) e ao indivíduo (GARNER et al., 1999). Assim como o glicerol (peso molecular de 92,10), o etileno glicol é um crioprotetor alcoólico, de baixo peso molecular (62,07), que tem sido testado na criopreservação de células espermáticas (ALVARENGA et al., 2005), em decorrência de sua menor toxicidade e maior capacidade de penetração na célula (SILVA, 2007).

As amidas formam o segundo grupo de crioprotetores penetrantes e, em virtude de seu baixo peso molecular (59,07), induzem menos danos osmóticos, embora não existam estudos relatando a sua permeabilidade através da membrana plasmática dos espermatozoides (ALVARENGA et al., 2005). A acetamida foi utilizada com sucesso na criopreservação de espermatozoides de coelhos, demonstrando melhor efeito crioprotetor do que o glicerol (KASHIWAZAKI et al., 2006; OKUDA et al., 2007). Entretanto, o mesmo não foi observado em espermatozoides equinos, onde a acetamida e a formamida determinaram baixa taxa de congelabilidade nestes gametas (SQUIRES et al., 2004).

Visando o aumento dos índices de nascimento após IA, particularmente por via cervical em ovelhas, os pesquisadores têm desenvolvido estudos em busca de melhorias da qualidade do sêmen congelado. Por conseguinte, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações dos crioprotetores glicerol, etileno glicol e acetamida na viabilidade *in vitro* de espermatozoides congelados de ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados quatro reprodutores (1 a 2 anos de idade), mestiços da raça Santa Inês, criados em sistema de confinamento, submetidos a iluminação natural (Recife-PE, Brasil; 8.0314 SL, 34.5252 W) e previamente submetidos a exames clínicos e andrológicos. Os carneiros foram mantidos isolados das fêmeas e alimentados com dieta composta de feno de tifton, sal mineral e água *ad libitum*, e suplementados com concentrado (500g/cabeça/dia).

Colheita e análise de sêmen

As colheitas de sêmen foram realizadas com vagina artificial na presença de uma fêmea como manequim, a intervalos de 48 horas, totalizando seis colheitas por reprodutor. Imediatamente após a colheita e aprovação dos ejaculados, procedeu-se à formação do *pool* de sêmen, o qual foi mantido em temperatura ambiente durante a realização das análises macroscópicas e microscópicas.

A avaliação macroscópica do sêmen foi realizada pela observação de volume (mL), aspecto e cor das amostras, aprovando-se apenas aquelas que se apresentaram dentro dos padrões considerados normais pelo Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998).

Os *pools* de sêmen foram avaliados microscopicamente quanto a turbilhonamento, motilidade progressiva, vigor, concentração, morfologia, integridade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e integridade do acrossoma. Para análise do turbilhonamento, uma alíquota (10 µL) de sêmen foi depositada sobre lâmina previamente aquecida (37 °C) e observada ao microscópio óptico (Olympus, Germany; 100 x), estabelecendo-se como padrão mínimo de aprovação o valor 3 (0-5). A motilidade progressiva (MP) e o vigor espermático foram estimados após colocação de uma alíquota (10 µL) de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas (37 °C), observada ao microscópio óptico (Olympus, Germany; 100 x), com aprovação das amostras que apresentaram valores mínimos de 70% (0-

100%) e 3,0 (0-5), respectivamente, de acordo com o Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998).

A concentração espermática foi determinada em Câmara de Neubauer (diluição 1:400 em formol citrato) e a morfologia espermática foi avaliada pelo método de Câmara Úmida (diluição 1:400 em formol citrato), de acordo com Mies Filho (1982).

Adicionalmente, foi realizada a análise de integridade da membrana plasmática (iMP) com diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e iodeto de propídio (IP), segundo a metodologia descrita e modificada por Coletto et al. (2002). Com este fim, alíquotas (50 μ L) de sêmen foram diluídas em 150 μ L de Tris contendo 5 μ L de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 μ L de IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 células foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Germany, 400 x), usando filtro de emissão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485/20 nm, sendo classificadas como portadoras de membrana intacta, quando se apresentavam coradas em verde, ou de membrana danificada, quando coradas em vermelho.

O potencial de membrana mitocondrial (PMM) foi determinado pela metodologia descrita por Guthrie e Welch (2006), com utilização do fluorocromo catiônico lipofílico JC-1. Para isto, alíquotas (50 μ L) de sêmen foram diluídas em Tris (150 μ L), contendo 5 μ L de JC-1 (0,15 mM em DMSO), incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 células foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Germany, 400 x), em filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação, e foram classificadas em alto potencial de membrana mitocondrial, quando a peça intermediária fluoresceu em laranja, e baixo potencial de membrana mitocondrial, quando a peça intermediária fluoresceu em verde.

A integridade do acrossoma (iAC) foi avaliada pela técnica de coloração *Fluorescein isothiocyanate-conjugated agglutin* (FITC-PNA), descrita por Roth et al. (1998). Esfregaços foram preparados com alíquotas de sêmen (10 μ L), secos em temperatura ambiente e armazenados a 4 °C protegidos da luz. No intervalo de duas semanas, os esfregaços foram corados com 30 μ L de FITC-PNA (na concentração de 100 μ g/mL), incubados por 20 minutos em Câmara Úmida a 4 °C, lavados em PBS e secos na ausência da luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 μ L de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de p-phenylenediamine) foi colocado sobre a lâmina e coberto com lamínula. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em

microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany, 1000 x), usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os gametas foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentavam a região acrossomal corada com fluorescência verde brilhante, 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.

Diluição e congelamento de sêmen

Após formação e análise, o *pool* dos ejaculados foi subdividido e diluído em Tris-gema de ovo (3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose; 100 mL de água destilada; 20% gema de ovo; pH 6,8), acrescido de diferentes crioprotetores, de acordo com os grupos experimentais: G1 = Tris-gema + 5 % glicerol (ACIBRA[®], Santo Amaro, São Paulo, Brasil); G2 = Tris-gema + 3 % etileno glicol (VETEC, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil); G3 = Tris-gema + 5 % etileno glicol; G4 = Tris-gema + 2 % acetamida (Fluka, Chemical Co. Inc., Tóquio, Japão); G5 = Tris-gema + 7 % acetamida.

A seguir, as amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL), contendo 100×10^6 espermatozoides, e processadas em sistema de criopreservação convencional, constituído por geladeira e vapor de nitrogênio. Imediatamente após a refrigeração (redução da temperatura de 27 °C a 5 °C, por 90 minutos), as palhetas foram mantidas a 5 °C durante 90 minutos, e, então, transferidas para a rampa de congelamento (redução de +5 °C a -120 °C, por 15 minutos). Após atingir a temperatura de -120 °C, as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenadas em botijão criobiológico.

Descongelamento e avaliação do sêmen criopreservado

Após intervalo mínimo de 24 horas da congelamento, as amostras de sêmen foram descongeladas à temperatura de 37 °C, durante 30 segundos, e avaliadas quanto a MP, vigor, iMP, PMM e iAC, conforme as técnicas descritas anteriormente.

Análise estatística

Para realização da análise estatística, os valores das amostras de sêmen descongeladas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias avaliadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey, sendo que os percentuais de MP, iMP, PMM e iAC foram transformados pelo arco seno ($\arcsin \sqrt{P/100}$). Utilizou-se o programa INSTAT para Windows (versão 3.01), com delineamento inteiramente casualizado e nível de significância de 5%.

RESULTADOS

O sêmen *in natura* dos reprodutores ovinos da raça Santa Inês apresentou aspecto predominantemente cremoso, coloração branco pérola, volume médio de $0,92 \pm 0,20$ mL/animal, concentração espermática de $3,92 \times 10^9 \pm 0,79$ espermatozoides/mL, 84,00% de espermatozoides morfolologicamente normais, $3,67 \pm 0,51$ de turbilhonamento, $85,83 \pm 5,85\%$ de MP e $4,17 \pm 0,41$ de vigor. Além disso, foram observados $68,08 \pm 9,75\%$ de espermatozoides com membrana plasmática íntegras (Figura 1; A1), $55,17 \pm 21,86\%$ com alto potencial de membrana mitocondrial (Figura 1; B1) e $45,25 \pm 14,99\%$ com acrossomas íntegros (Figura 1; C1).

Após avaliação das amostras de sêmen criopreservadas em diluidor à base de Tris-gema, na presença de diferentes crioprotetores (Tabela 1), observou-se que o grupo G1 ($49,17 \pm 4,92\%$) apresentou maior MP ($P < 0,05$) do que os grupos G3 ($33,33 \pm 10,33\%$), G4 ($3,50 \pm 1,64\%$) e G5 ($3,83 \pm 3,25\%$), porém sem diferença significativa ($P > 0,05$) em relação a G2 ($41,67 \pm 7,53\%$). O vigor evidenciou que os grupos G1 ($3,17 \pm 0,75$), G2 ($3,50 \pm 0,55$) e G3 ($2,83 \pm 0,41$) não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre si, mas foram superiores ($P < 0,05$) às amostras dos grupos G4 ($1,33 \pm 0,52$) e G5 ($1,67 \pm 0,52$).

O maior percentual de células com iMP ($P < 0,05$) foi observado no G1 ($38,17 \pm 16,39\%$), em relação aos grupos G2 ($17,50 \pm 7,18\%$), G3 ($15,25 \pm 6,16\%$), G4 ($1,17 \pm 0,41\%$) e G5 ($1,25 \pm 0,42\%$). Do mesmo modo, as amostras de sêmen dos grupos G2 e G3 apresentaram maior ($P < 0,05$) iMP de que as dos grupos G4 e G5. Em contrapartida, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais nas análises de PMM e iAC.

DISCUSSÃO

Após avaliação do sêmen *in natura* dos reprodutores ovinos da raça Santa Inês, constatou-se que todos os parâmetros seminais exibiram valores acima dos recomendados por Mies Filho (1982) e pelo Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998). Entretanto, a porcentagem de espermatozoides com acrossomas intactos manteve-se abaixo dos 70,00% recomendados pelo Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998).

Os parâmetros espermáticos das amostras de sêmen submetidas ao processo de criopreservação, na presença de etileno glicol ou acetamida, não apresentaram resultados estatisticamente superiores àqueles obtidos com a criopreservação utilizando glicerol. Ressalta-se, todavia, que apenas as amostras de sêmen criopreservadas com glicerol (G1) e etileno glicol (G2 e G3) apresentaram percentuais médios de células móveis (MP) compatíveis com o valor mínimo de 30,00%, descrito pelo Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998) para sêmen descongelado. Da mesma forma, os valores obtidos para o vigor espermático das amostras dos grupos G1 e G2 foram considerados normais pelo Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998).

Os resultados acima descritos corroboram com o exposto por Moraes et al. (1998) e Brisola et al. (1999), ao relatarem não haver diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos com glicerol (0,72 M) e etileno glicol, em concentrações menores (0,5 M/2,8%), quanto a MP e vigor de espermatozoides criopreservados de ovinos, o que foi evidenciado no presente estudo entre os grupos controle (glicerol a 5%) e etileno glicol a 3%. Neste estudo, a utilização de etileno glicol a 5% corrobora com Moraes et al. (1998), ao afirmarem que concentrações mais elevadas (0,7 M/3,9%) deste crioprotetor determina efeito negativo na motilidade e no vigor espermático. Da mesma forma, Souza et al. (2002) e Bittencourt et al. (2004) demonstraram que o uso do etileno glicol na congelação do sêmen caprino, na mesma concentração do glicerol (7%), apresentou baixo efeito crioprotetor.

Ao se utilizar acetamida (G4 e G5) na congelação de espermatozoides de ovinos pode-se observar redução significativa ($P < 0,50$) de MP e vigor, contrariando os achados de Kashiwazaki et al. (2006) e Okuda et al. (2007), os quais observaram que a criopreservação de espermatozoides de coelhos, na presença de 1M e 2% de acetamida, respectivamente, apresentaram melhores resultados ($P < 0,05$) do que ao utilizarem as

mesmas concentrações de glicerol. Por outro lado, foram confirmados os relatos de Squires et al. (2004), que, ao trabalharem com espermatozoides equinos, obtiveram menor motilidade e preservação das células com o uso de 0,55 M de acetamida, o que fortalece a suspeita da existência de variações nos resultados de acordo com a espécie e o indivíduo (SQUIRES et al., 2004).

Neste estudo, o glicerol a 5% (G1) foi mais eficaz na preservação ($P>0,05$) da iMP dos espermatozoides ovinos do que o etileno glicol e a acetamida, manifestando valor compatível ao encontrado por Carvalho et al. (2008), ao trabalharem com Tris-gema glicerol para a congelação do sêmen ovino. Tal fato contraria os relatos de Brisola et al. (1999), com sêmen de ovino (0,5 M etileno glicol/0,72 M glicerol), e os de Kashiwazaki et al. (2006) e Okuda et al. (2007), com sêmen de coelhos (1 M acetamida/1 M glicerol e 2% acetamida/2% glicerol, respectivamente), os quais relataram a superioridade do etileno glicol e da acetamida na manutenção da integridade da membrana plasmática. Em contrapartida, o efeito negativo obtido no presente estudo com a utilização da acetamida como crioprotetor, ratifica os relatos de Squires et al. (2004) para espermatozoides equinos, demonstrando que este agente apresenta baixa propriedade crioprotetora, o que foi confirmado pelo baixo percentual de motilidade das células espermáticas.

Apesar de não terem sido evidenciadas diferenças significativas ($P>0,05$) no PMM entre os grupos experimentais, e o crioprotetor acetamida ter mantido a produção energética das células espermáticas, os grupos criopreservados com esta amida sofreram danos nas demais estruturas dos espermatozoides, tornando inviável seu uso na IA. Isto porque, embora a redução da produção energética esteja diretamente relacionada à perda de movimento, a imobilidade da célula também pode estar associada a mudanças no transporte ativo e na permeabilidade da membrana plasmática, assim como aos danos dos componentes do axonema (WATSON, 1995). Desta forma, em virtude da produção de energia no interior das mitocôndrias ser dependente das membranas (BELL et al., 1993), esperava-se que a ocorrência de pequeno percentual de gametas com iMP, observada nas amostras de sêmen congeladas com etileno glicol (3 e 5%) e acetamida (2 e 7%), determinasse menor produção de ATP mitocondrial.

Ressalta-se que os percentuais de espermatozoides com acrossomas íntegros (iAC) em todos os grupos avaliados foram considerados dentro do limite mínimo de 30% proposto por Evans e Maxwell (1987) para sêmen congelado de carneiro, sem apresentarem diferença significativa ($P>0,05$) entre eles, apesar de os grupos

criopreservados com etileno glicol (G2 e G3) terem sido numericamente superiores aos tratados com glicerol (G1) ou acetamida (G4 e G5). Tal achado corrobora com Brisola et al. (1999), ao demonstrarem não haver diferença significativa entre o glicerol (0,72 M) e o etileno glicol (0,5 M) para a proteção do acrossoma, contrariando deste modo os relatos de Moraes et al. (1998), de que baixas concentrações de etileno glicol (0,5 M) conferem maior proteção à estrutura acrossomal do que o glicerol (0,72 M).

Em geral, foi observado que o etileno glicol não determinou maior manutenção dos parâmetros seminais de espermatozoides criopreservados de ovinos, quando comparados com as amostras criopreservadas com glicerol, e que a acetamida foi nociva às células espermáticas, fato que ratifica a constatação de resultados contraditórios sobre o efeito dos crioprotetores espermáticos (SILVA, 2007). A partir disto, foi fortalecida a suposta existência de variações de acordo com a espécie e o indivíduo na resposta dos espermatozoides à ação dos crioprotetores (SQUIRES et al., 2004; KASHIWAZAKI et al., 2006), o que pode estar associado a diferenças na permeabilidade das membranas dos espermatozoides a estes agentes (OKUDA et al., 2007), decorrente de prováveis diferenças na composição das membranas dos espermatozoides dependendo da espécie.

Os resultados deste estudo ratificam a afirmação de que a composição da membrana, constituída de uma mistura heterogênea de fosfolipídeos, glicolipídeos e esteroides, embora similar para todos os espermatozoides, sofre variações na sua distribuição lipídica entre as espécies, alterando a fluidez da membrana de espermatozoides mamíferos (LADHA, 1998).

A maior concentração de lipídeos como colesterol na membrana é responsável pelo aumento de sua rigidez e conseqüente redução da permeabilidade (LADHA, 1998), conforme pode ser observado em espermatozoides de coelhos, quando comparados aos de bovinos (GIRAUD et al., 2000) e ovinos (SALAMON e MAXWELL, 2000) que são ricos em ácidos graxos insaturados (SANOCKA e KURPISZ, 2004; VALENÇA e GUERRA, 2007), responsáveis pelo aumento de sua fluidez (LADHA, 1998). Desta forma, a menor concentração de colesterol e maior concentração de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática dos espermatozóides ovinos deve ter determinado, neste estudo, a maior permeabilidade dos crioprotetores etileno glicol e acetamida, cujos pesos moleculares (62,07 e 59,07, respectivamente) são menores do que o do glicerol (92,10).

Além disso, a composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides interfere na sua temperatura de transição, afetando a sensibilidade

destes gametas ao choque frio (LADHA, 1998). Desta forma, o fato dos espermatozoides ovinos apresentarem três fases de transição (37°C, 26°C e 17°C) pode ter contribuído para a grande ocorrência de estresses nas células espermáticas decorrentes do processo de congelação/descongelação (MÜLLER et al., 2008), principalmente nas amostras congeladas com etileno glicol (G2 e G3) e acetamida (G4 e G5).

Associado a isto, em decorrência de sua composição, a membrana plasmática dos espermatozoides de carneiros possuem elevada permeabilidade ao glicerol (SALAMON e MAXWELL, 2000), o que determina menor estresse osmótico e, conseqüentemente, menor ação tóxica deste crioprotetor sobre as células (ALVARENGA et al., 2005). Sendo assim, é possível supor que, neste estudo, as lesões ocasionadas pela adição de acetamida em maior proporção do que ao se utilizar glicerol ou etileno glicol tenham sido determinadas pela maior penetração desta substância, em decorrência de seu baixo peso molecular e das menores barreiras existentes nas membranas dos espermatozoides ovinos, tornando-se tóxica a estes gametas, conforme relatado por WATSON (2000).

CONCLUSÃO

A partir dos resultados de motilidade progressiva, vigor e integridade de membrana plasmática pode-se concluir que o glicerol (5%) é mais eficaz na proteção dos espermatozoides ovinos submetidos aos efeitos deletérios da congelação do que o etileno glicol (3 e 5%) e a acetamida (2 e 7%).

AGRADECIMENTOS

À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), pela concessão de bolsa de mestrado e suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion sêmen: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 105-113, 2005.

- BELL, M.; WANG, R.; HELLSTROM, W.J.G.; SIKKA, S.C. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 6, p. 472-478, 1993.
- BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO, A.L.; SANTOS, A.D.F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R. B.S.; CHALHOUN, M.; PORTELA, A.P.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, J.D. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.
- BRISOLA, L.B.S.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; MONTAGNER, M.M. Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados com etileno glicol. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 527-531, 1999.
- CARVALHO, F.P.; SILVA, J.F.S.; SOUZA, G.V.; QUIRINO, C.R.; CARVALHO, C.S.P. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 3, p. 612-620, 2008.
- 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.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Sydney: Butterworths, 1987, 194 p.
- FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v. 53, p. 81-89, 2007.
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction Domestic Animal**, v. 34, p. 399-404, 1999.
- GIRAUD, M.N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, n. 10, p. 2160-2164, 2000.
- 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.

- KASHIWAZAKI, N.; OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White Rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 4, p. 511-516, 2006.
- LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v. 165, p. 1-10, 1998.
- Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2ª ed., Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), 1998, 49 p.
- MELO, C.M.; ZAHN, F.S.; MARTIN, I.; ORLANDI, C.; DELL'AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 27, n. 4, p. 171-175, 2007.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial.** 5ª ed. Porto Alegre: Livraria Sulina Editora, v. 2, p. 353-783, 1982.
- MORAES, C.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; SCHWEITZER, C.M. Criopreservação do sêmen ovino em *pellets* com etileno glicol. **Ciência Rural**, v. 28, n. 2, p. 287-292, 1998.
- MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; PINCEMY, G.; KURZ, A.; LABBE, C. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 390-399, 2008.
- OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T.; KAMIJO, S.; KASHIWAZAKI, N. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese White Rabbits. **Experimental Animals**, v. 56, n. 1, p. 29-34, 2007.
- PERIS, S.I; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 2, p. 224-133, 2004.
- 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, L.M. BUSH, L.M.; 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. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 12-18, 2004.

SILVA, A.R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 119-127, 2007.

SOUZA, A.F., GUERRA, M.M.P., BATISTA, A.M., MERGULHÃO, F.C.C., NEVES, A.C., WISCHRAL, A. Congelamento de sêmen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl. 5, p. 103-105, 2002.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHEM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1056-1065, 2004.

VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.

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

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.

Tabela 1 - Parâmetros espermáticos de amostras de sêmen obtidas de reprodutores ovinos da raça Santa Inês e criopreservadas com glicerol (5%), etileno glicerol (3 e 5%) ou acetamida (2 e 7%)

Parâmetros espermáticos	Grupos Experimentais				
	G1	G2	G3	G4	G5
MP (%)	49,17 ± 4,92 ^a	41,67 ± 7,53 ^{ab}	33,33 ± 10,33 ^b	3,50 ± 1,64 ^c	3,83 ± 3,25 ^c
Vigor (0-5)	3,17 ± 0,75 ^a	3,50 ± 0,55 ^a	2,83 ± 0,41 ^a	1,33 ± 0,52 ^b	1,67 ± 0,52 ^b
iMP (%)	38,17 ± 16,39 ^a	17,50 ± 7,18 ^b	15,25 ± 6,16 ^b	1,17 ± 0,41 ^c	1,25 ± 0,42 ^c
aPMM(%)	62,67 ± 18,13	69,08 ± 22,53	60,58 ± 19,54	75,92 ± 24,94	64,92 ± 25,37
iAC (%)	33,25 ± 10,21	39,75 ± 13,28	42,25 ± 11,42	34,17 ± 10,59	31,00 ± 18,30

Letras diferentes na mesma linha indicam $P < 0,05$. MP= motilidade progressiva; iMP= integridade de membrana plasmática; aPPM= alto potencial de membrana mitocondrial; iAC= integridade de acrossoma; G1 = Tris-gema + glicerol 5 %; G2 = Tris-gema + etileno glicol 3 %; G3 = Tris-gema + etileno glicol 5 %; G4 = Tris-gema + acetamida 2 %; G5 = Tris-gema + acetamida 7 %.

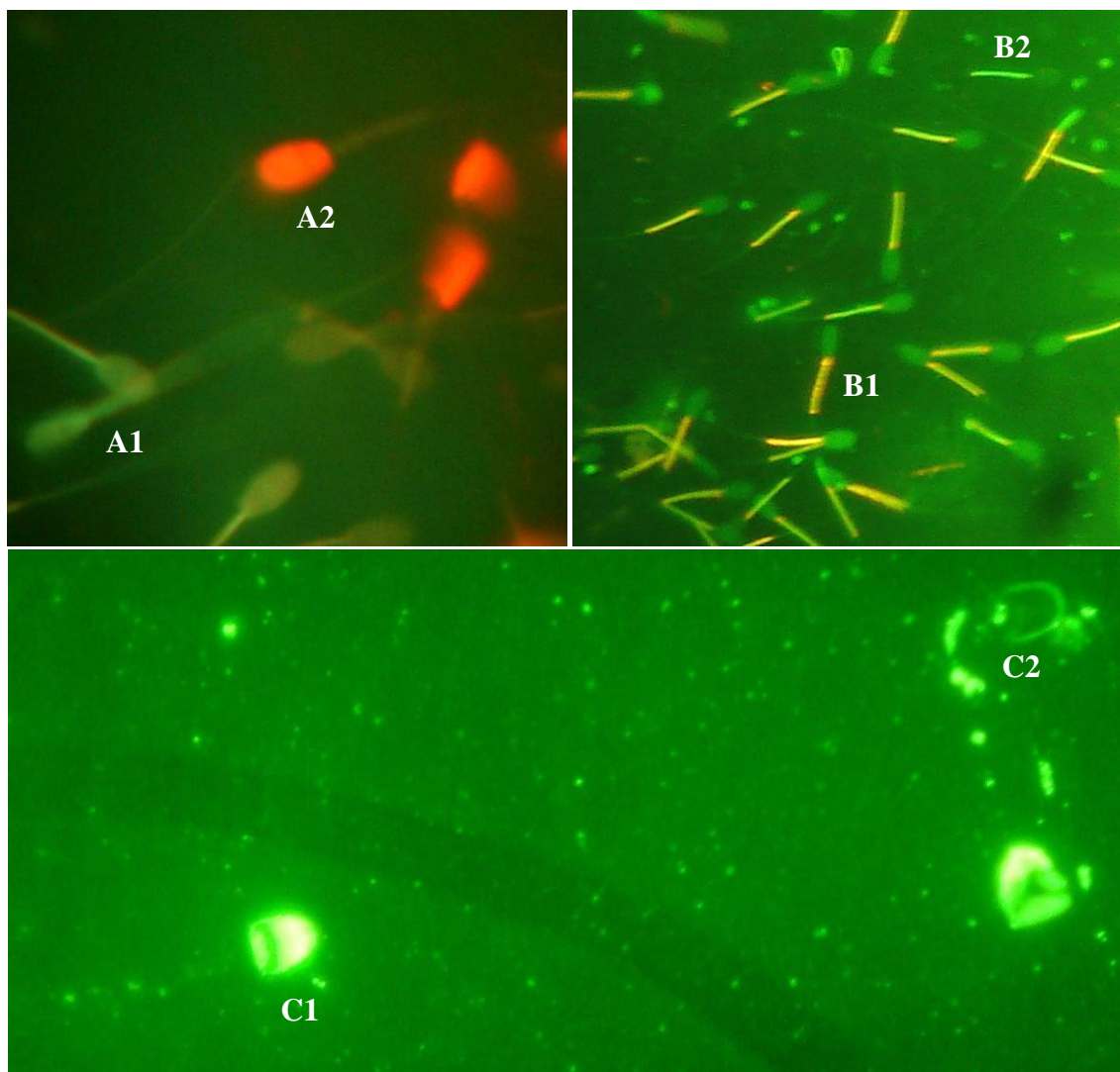


Figura 1 – Espermatozoides ovinos com membrana plasmática íntegra (A1), corada em verde pelo diacetato de carboxifluoresceína (DCF), e lesionada (A2), corada em vermelho pelo iodeto de propídeo (IP); espermatozoides ovinos com alto (B1) e baixo (B2) potencial de membrana mitocondrial corados, respectivamente, em laranja e verde pelo fluorocromo JC-1; espermatozoides ovinos com acrossomas intactos (C1) e reagidos (C1), após coloração com o *fluorescein isothiocyanate-conjugated aglutin* (FITC-PNA).

4.2 Efeito dos antioxidantes resveratrol e quercetina na viabilidade *in vitro* de espermatozoides congelados de ovinos

Effect of quercetin and resveratrol antioxidants on the in vitro viability of ram thawed sperm

**Ellen Cordeiro Bento da Silva, Jobson Felipe de Paula Cajueiro,
Sildivani Valcácia Silva, Maria Madalena Pessoa Guerra**

Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária da
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE

RESUMO

Objetivando-se avaliar o efeito da adição dos antioxidantes resveratrol (R) e quercetina (Q) na viabilidade *in vitro* de espermatozoides congelados de ovinos, foram utilizados quatro reprodutores adultos, mestiços da raça Santa Inês. Após colheita com vagina artificial, alíquotas de sêmen foram avaliadas macroscópica e microscopicamente. A seguir, procedeu-se à formação do *pool* das amostras de sêmen, avaliação, diluição em Tris-gema contendo 5% de glicerol, acrescido de antioxidantes [Exp. 1: resveratrol (0, 5, 10, 15 e 20 µg/mL, respectivamente, R0, R5, R10, R15 e R20); Exp. 2: quercetina (0, 5, 10, 15 e 20 µg/mL, respectivamente, Q0, Q5, Q10, Q15 e Q20); Exp. 3: sem antioxidante (RQ0), 10 µg/mL de resveratrol (R10), 5 µg/mL de quercetina (Q5) e 10 µg/mL de resveratrol + 5 µg/mL de quercetina (R10Q5)]. As amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL), congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C). Após descongelação (37 °C/30 segundos), as amostras foram avaliadas quanto a motilidade progressiva (MP), vigor, integridade de membrana plasmática (iMP), potencial de membrana mitocondrial (PMM) e integridade do acrossoma (iAC). Não se observou diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos nos parâmetros de MP, vigor, iMP e iAC. No Exp. 1, o grupo controle (R0) apresentou percentual ($36,67\pm 8,01\%$) de PMM superior ao do grupo R20 ($22,33\pm 6,16\%$); no Exp. 2, o grupo sem adição de antioxidante (Q0) evidenciou percentual ($36,25\pm 8,12\%$) de PMM superior ($P<0,05$) ao do Q10 ($9,33\pm 6,54\%$), Q15 ($6,25\pm 5,98\%$) e Q20 ($5,17\pm 5,08\%$), assim como o Q5 ($20,58\pm 12,05\%$) foi superior ($P<0,05$) ao Q15 e Q20; no Exp. 3, o RQ0 ($39,00\pm 16,79\%$) foi superior ($P<0,05$) ao Q5 ($18,00\pm 13,76\%$) e R10Q5 ($14,42\pm 7,47\%$). Conclui-se que a adição dos antioxidantes fenólicos resveratrol e quercetina, isolados ou em associação, reduz o potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides ovinos submetidos à congelamento.

Palavras chave: carneiro, criopreservação, flavonoides, não flavonoides, polifenóis, sêmen.

ABSTRACT

Aiming to evaluate the effect of antioxidant resveratrol (R) and quercetin (Q) addition on *in vitro* viability of ram thawed semen, four mature Santa Inês crossbred males were used. After collect using an artificial vagina, aliquots of semen were evaluated macroscopic and microscopically. Then, proceeded the pool of semen formation, evaluation, dilution in Tris-yolk egg containing 5% glycerol, plus antioxidants [Exp 1: resveratrol (0, 5, 10, 15 and 20 µg/mL, respectively, R0, R5, R10, R15 and R20); Exp 2: quercetin (0, 5, 10, 15 and 20 µg/mL, respectively, Q0, Q5, Q10, Q15 and Q20); Exp 3: without antioxidant (RQ0), 10 µg/mL of resveratrol (R10), 5 µg/mL of quercetin (Q5), and 10 µg/mL of resveratrol + 5 µg/mL of quercetin (R10Q5)]. The samples were packaged in straws (0.25 mL), frozen and stored in liquid nitrogen (-196 °C). After thawing (37 °C/30 seconds), samples were evaluated for progressive motility (PM), vigor, plasma membrane integrity (PMi), mitochondrial membrane potential (MMP) and acrosome integrity (ACi). No significant difference was observed ($P > 0.05$) among groups in MP, vigor, PMi and ACi parameters. In Exp 1, the control group (R0) showed percentage ($36.67 \pm 8.01\%$) of MMP higher than R20 ($22.33 \pm 6.16\%$); in Exp 2, the group without antioxidant (Q0) showed percentage ($36.25 \pm 8.12\%$) of PMM higher ($P < 0.05$) than Q10 ($9.33 \pm 6.54\%$), Q15 ($6.25 \pm 5.98\%$) and Q20 ($5.17 \pm 5.08\%$), as well as Q5 ($20.58 \pm 12.05\%$) was higher ($P < 0.05$) than Q15 and Q20; in Exp 3, RQ0 ($39.00 \pm 16.79\%$) was higher ($P < 0.05$) than Q5 ($18.00 \pm 13.76\%$) and R10Q5 ($14.42 \pm 7.47\%$). It can be concluded that the addition of resveratrol and quercetin phenolic antioxidants alone or in combination, reduce the mitochondrial membrane potential of sperm ram submitted to freezing.

Keywords: Ram, cryopreservation, flavonoids, non flavonoids, polyphenols, semen.

INTRODUÇÃO

A necessidade da utilização intensiva de reprodutores ovinos em diferentes locais e épocas do ano fez intensificar as investigações a respeito do armazenamento de espermatozoides em condições artificiais (SALAMON e MAXWELL, 2000). Apesar dos benefícios do uso do sêmen congelado, sabe-se que o processo de criopreservação causa injúrias letais e subletais aos espermatozoides (HOLT, 2000), classificadas como ultraestruturais, bioquímicas ou funcionais (SALAMON e MAXWELL, 1995), que reduzem a capacidade fertilizante destes gametas após o uso na inseminação artificial (WATSON, 2000).

Além disso, a criopreservação induz à formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS), com consequentes danos oxidativos e redução da função espermática (WATSON, 2000). Por conseguinte, a excessiva produção de ROS (SALEH e AGARWAL, 2002), associada a falhas no sistema de defesa antioxidante (FERREIRA e

MATSUBARA, 1997), determina estresse oxidativo e, conseqüentemente, reduz a capacidade fertilizante dos espermatozoides (GUERRA et al., 2004).

Os substratos moleculares mais frequentes das ROS são os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, nucleotídeos do DNA, proteínas e carboidratos (ORTEGA et al., 2003; SANOCKA e KURPISZ, 2004). Desta forma, em virtude das elevadas concentrações de lipídios poli-insaturados em sua membrana (AITKEN, 1997; SANOCKA e KURPISZ, 2004; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006), os espermatozoides dos mamíferos apresentam maior susceptibilidade aos danos ocasionados pela excessiva produção de ROS (AURICH, 2005).

A sobrevivência e a funcionalidade dos espermatozoides dependem da manutenção do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (FRAGA et al., 1991; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006). Em virtude disto, estudos têm sido desenvolvidos a fim de evitar o estresse oxidativo através da modificação das condições ambientais ou da utilização de substâncias antioxidantes (SOARES, 2002), especialmente durante os processos de congelação e descongelação (ORTEGA et al., 2003).

Entretanto, apesar de seu benéfico papel, o tratamento dos espermatozoides com antioxidantes (LOPES et al., 1998; MARQUES et al., 2002; SARLÓS et al., 2002) tem determinado resultados variáveis de acordo com a espécie animal, o meio diluidor (RUIZ et al., 2007) e o tipo de antioxidante utilizado (SIKKA, 2004). O trans-resveratrol e a quercetina são polifenóis não flavonoide e flavonoide, respectivamente, com poder antioxidante mais potente do que o das vitaminas E e C (STOJANOVIĆ et al., 2001), com baixa toxicidade (JUAN et al., 2005; DAVID, et al., 2007). Estes compostos fenólicos atuam como captadores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na de propagação do processo oxidativo, prevenindo a oxidação lipídica (SOARES, 2002; DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

Em virtude da controvérsia a respeito dos benefícios da adição de substâncias antioxidantes aos espermatozoides, assim como do tipo e da concentração ideal destes antioxidantes, a fim de minimizar os prejuízos causados pela remoção do plasma seminal ou da diluição durante os processos de criopreservação (GUERRA et al., 2004), objetivou-se com a realização deste trabalho avaliar o efeito da adição dos antioxidantes resveratrol e quercetina na viabilidade *in vitro* de espermatozoides criopreservados de ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados quatro reprodutores (1 a 2 anos de idade), mestiços da raça Santa Inês, criados em sistema de confinamento, submetidos a iluminação natural (Recife-PE, Brasil; 8.0314 SL, 34.5252 W) e previamente sujeitos a exames clínicos e andrológicos. Os carneiros foram mantidos isolados das fêmeas e alimentados com dieta composta de feno de tifton, sal mineral e água *ad libitum*, e suplementados com concentrado (500g/cabeça/dia).

Colheita e análise de sêmen

Os carneiros foram submetidos a colheitas de sêmen nos meses de Julho e Agosto (temperatura máxima de 27 °C e mínima de 20 °C), com intervalos de 48 horas, utilizando vagina artificial e uma fêmea como manequim. Foram obtidos seis ejaculados de cada reprodutor, totalizando 24 amostras de sêmen. Imediatamente após a colheita e aprovação dos ejaculados, procedeu-se à formação do *pool* de amostras de sêmen, o qual foi mantido em temperatura ambiente durante a realização das análises macroscópicas e microscópicas. A avaliação macroscópica do sêmen foi realizada através da observação do volume (mL), aspecto e cor dos ejaculados, aprovando-se apenas aqueles que se apresentaram dentro dos padrões considerados normais pelo Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998).

Para a análise dos parâmetros microscópicos foram realizadas avaliações do turbilhonamento, através da deposição de uma alíquota (10 µL) de sêmen sobre lâmina previamente aquecida a 37 °C e observada ao microscópio óptico (Olympus, Germany; 100 x), estabelecendo-se como padrão mínimo de aprovação o valor 3 (0-5). A motilidade progressiva (MP) e o vigor espermático foram estimados após colocação de uma alíquota (10 µL) de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37 °C e avaliada ao microscópio óptico (Olympus, Germany; 100 x), com aprovação das amostras que apresentaram valores mínimos de 70% (0-100%) e 3,0 (0-5), respectivamente, de acordo com o Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998).

A concentração espermática foi determinada em Câmara de Neubauer (diluição 1:400, em formol citrato) e a morfologia espermática foi avaliada pelo método de Câmara Úmida (diluição 1:400, em formol citrato), de acordo com Mies Filho (1982).

A análise de integridade da membrana plasmática (iMP) foi realizada utilizando-se diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e iodeto de propídio (IP), segundo a metodologia descrita e modificada por Coletto et al. (2002). Com este fim, 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 durante 10 minutos a temperatura ambiente e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 células foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Germany, 400 x), usando filtro de emissão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485/20 nm, sendo classificadas como portadoras de membrana intacta, quando apresentavam-se coradas em verde, ou de membrana danificada, quando coradas em vermelho.

Para a determinação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) foi utilizada a metodologia descrita por Guthrie e Welch (2006), com utilização do fluorocromo catiônico lipofílico JC-1. Para isto, 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 temperatura ambiente e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 células foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Germany, 400 x) com filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação, as quais foram classificadas em alto potencial de membrana mitocondrial, quando a peça intermediária fluoresceu em laranja, e baixo potencial de membrana mitocondrial, quando a peça intermediária fluoresceu em verde.

A integridade do acrossoma (iAC) foi avaliada pela técnica de coloração *Fluorescein isothiocyanate-conjugated agglutinin* (FITC-PNA), utilizada por Roth et al. (1998). Para isto, esfregaços foram preparados com alíquotas de sêmen (10 μL), submetidos à secagem em temperatura ambiente e armazenados a 4 °C, protegidos da luz. No intervalo de duas semanas, os esfregaços foram corados com 30 μL de FITC-PNA (na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$) e incubados por 20 minutos em Câmara Úmida a 4 °C, na ausência da luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 μL de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de p-phenylenediamine) foi colocado sobre a lâmina e coberto com lamínula. Um total de 200 espermatozoides por lâmina foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany, 1000 x), usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os gametas

foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentavam a região acrossomal corada com fluorescência verde brilhante, 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.

Diluição e congelação de sêmen

Após formação e avaliação do *pool* dos ejaculados, o mesmo foi subdividido e diluído em Tris-gema de ovo contendo 5% de glicerol (3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose; 100 mL de água destilada, deionizada e autoclavada; 20% gema de ovo; pH 6,8), acrescido de antioxidantes de acordo com os experimentos e grupos experimentais. Exp. 1: resveratrol [(SINOEXTRACT LTDA, Guangzhou, China) 0, 5, 10, 15 e 20 µg/mL, respectivamente, R0, R5, R10, R15 e R20]; Exp. 2: quercetina [(IFFECT CHEMPHAR CO. LTDA, Hong Kong, China) 0, 5, 10, 15 e 20 µg/mL, respectivamente, Q0, Q5, Q10, Q15 e Q20)]; Exp. 3: sem antioxidante (RQ0), 10 µg/mL de resveratrol (R10), 5 µg/mL de quercetina (Q5) e 10/mL µg de resveratrol + 5 µg/mL de quercetina (R10Q5). A diluição foi efetuada de modo que, ao final, cada dose inseminante contivesse 400×10^6 espermatozoides/mL.

A seguir, as amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL), e processadas em sistema de criopreservação convencional, constituído por geladeira e vapor de nitrogênio. Imediatamente após a refrigeração (redução da temperatura de 27 °C a 5 °C, por 90 minutos), as palhetas foram mantidas a 5 °C durante 90 minutos, e, a seguir, transferidas para a rampa de congelação (redução de +5 °C a -120 °C, por 15 minutos). Após atingir a temperatura de -120 °C, as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenadas em botijão criobiológico.

Descongelação e avaliação do sêmen criopreservado

Após intervalo mínimo de 24 horas da congelação, as amostras de sêmen foram descongeladas à temperatura de 37 °C, durante 30 segundos, e avaliadas quanto à MP, vigor, iMP, PMM e iAC, conforme as técnicas anteriormente descritas.

Análise estatística

Para realização da análise estatística, os valores das amostras de sêmen descongeladas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias avaliadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey, sendo que os percentuais de MP, iMP, PMM e iAC foram transformados pelo arco seno ($\sqrt{P/100}$). Utilizou-se o programa INSTAT para Windows (versão 3.01), com delineamento inteiramente casualizado e nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Experimento 1

A avaliação do sêmen *in natura* dos reprodutores ovinos evidenciou volume médio de $0,93 \pm 0,12$ mL, aspecto predominantemente cremoso e cor branca perolado. Para o turbilhonamento, motilidade e vigor foram encontrados valores médios de $4,25 \pm 0,42$, $85,83 \pm 4,92\%$ e $4,33 \pm 0,52$, respectivamente. A concentração espermática foi de $4,85 \times 10^9 \pm 2,20$ espermatozoides/mL e a porcentagem de células morfologicamente normais de 81,00%. Foram verificadas iMP de $64,67 \pm 3,74\%$, PMM de $66,92 \pm 9,24\%$ e iAC de $83,58 \pm 6,75\%$.

Após avaliação das amostras de sêmen criopreservadas em diluidor à base de Tris-gema, glicerol 5% e resveratrol (Tabela 1) não foram constatadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais para os parâmetros MP, vigor, iMP e iAC. Entretanto, o PMM do grupo R0 ($36,67 \pm 8,01\%$) foi superior ($P < 0,05$) ao do R20 ($22,33 \pm 6,16\%$), não diferindo dos demais grupos experimentais (R5= $27,08 \pm 6,46\%$; R10= $27,50 \pm 6,95\%$; R15= $31,92 \pm 7,72\%$).

Experimento 2

Na avaliação do sêmen *in natura* dos reprodutores ovinos da raça Santa Inês, foi observado volume médio de $0,88 \pm 0,19$ mL, aspecto predominantemente cremoso e cor branca perolado. Os valores médios de turbilhonamento, MP e vigor foram de $4,25 \pm 0,42$, $85,83 \pm 4,92\%$ e $4,17 \pm 0,41$, respectivamente; concentração de $4,88 \times 10^9 \pm 2,19$

espermatozoides/mL e percentual de células morfológicamente normais de 80,00%. Constatou-se iMP de $66,08 \pm 6,38\%$, PMM de $68,42 \pm 9,96\%$ e iAC de $80,67 \pm 6,68\%$.

Após descongelamento das amostras de sêmen criopreservadas em diluente à base de Tris-gema, glicerol 5% e quercetina (Tabela 2), não foram observadas diferença significativa ($P > 0,05$) para MP, vigor, iMP e iAC. Em contrapartida, o PMM do Q0 ($36,25 \pm 8,12\%$) foi superior ($P < 0,05$) ao do Q10 ($9,33 \pm 6,54\%$), Q15 ($6,25 \pm 5,98\%$) e Q20 ($5,17 \pm 5,08\%$).

Experimento 3

Na avaliação dos ejaculados *in natura* dos reprodutores ovinos foi observado volume médio de $0,84 \pm 0,25$ mL, aspecto predominantemente cremoso e cor branca perolado. Os valores médios de turbilhamento, MP e vigor foram, respectivamente, de $4,16 \pm 0,41$, $89,17 \pm 4,92\%$ e $4,08 \pm 0,20$. A concentração espermática foi de $3,87 \times 10^9 \pm 0,54$ espermatozoides/mL e o percentual de células morfológicamente normais de 87,00%. Em contrapartida, a iMP foi de $67,08 \pm 10,11\%$, o PMM de $51,50 \pm 12,24\%$ e a iAC de $76,83 \pm 13,18\%$.

A avaliação das amostras de sêmen criopreservadas em diluidor à base de Tris-gema, glicerol 5%, resveratrol e quercetina (Tabela 3) não se constatou diferença significativa ($P > 0,05$) para MP, vigor, iMP e iAC dos espermatozoides congelados na presença de quercetina, resveratrol ou associação destes. Em contrapartida, o PMM do grupo RQ0 ($39,00 \pm 16,79\%$) foi superior ($P < 0,05$) aos dos grupos Q5 ($18,00 \pm 13,76\%$) e R10Q5 ($14,42 \pm 7,47\%$).

DISCUSSÃO

Para o sêmen ovino *in natura*, todos os parâmetros seminais avaliados apresentaram valores recomendados por Mies Filho (1982) e pelo Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998).

A partir das avaliações das amostras de sêmen criopreservadas dos reprodutores ovinos, mestiços da raça Santa Inês, pode-se constatar que a adição dos antioxidantes resveratrol, quercetina ou sua associação, não determinou melhora significativa ($P > 0,05$) nos parâmetros espermáticos analisados. Entretanto, todos os grupos apresentaram valores de MP e vigor compatíveis com o mínimo de 30,00% e 3,

respectivamente, descritos pelo Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (1998), tendo sido verificado que os grupos criopreservados com antioxidantes apresentaram valores de MP (Exp 1: R10; Exp 2: Q5, Q10 e Q20; Exp 3: R10, Q5 e R10Q5) e vigor (Exp 1: R5, R10 e R20; Exp 2: Q5, Q10, Q15 e Q20; Exp 3: R10, Q5 e R10Q5) numericamente superiores aos do grupo controle. Tal fato também foi observado por SARLÓS et al. (2002), que, ao utilizarem o resveratrol no sêmen ovino refrigerado a 5 °C por 9 dias, obtiveram melhoria, neste caso, significativa de parâmetros como a motilidade (dia 1: 85,00%; dia 2: 75,30%; dia 3: 56,50%; dia 6: 51,50%; dia 8: 48,50%; dia 9: 42,50%), se comparado ao grupo controle (dia 1: 78,30%; dia 2: 78,00%; dia 3: 58,50%; dia 6: 39,00%; dia 8: 36,50%; dia 9: 18,50%), em virtude da atuação protetora deste agente.

Os valores percentuais de iMP nos três experimentos foram similares ao de estudos anteriormente realizados com sêmen criopreservado de ovinos em diluidor à base de tris-gema sem antioxidantes (CARVALHO et al., 2008) e não demonstrou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos dos diferentes experimentos, embora, em termos numéricos, a adição dos polifenóis resveratrol e quercetina tenha determinado melhoria deste parâmetro (Exp 1: R5, R10, R15 e R20; Exp 2: Q5, Q10 e Q15; Exp 3: Q5) em relação ao grupo controle, o que provavelmente ocorreu em virtude das ações antioxidantes e inibidora da peroxidação lipídica dos compostos fenólicos (STOJANOVIĆ et al., 2001; SARLÓS et al., 2002). Em contrapartida, o PMM evidenciou redução de seus valores com o aumento da concentração dos antioxidantes (Exp 1, 2 e 3), havendo diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos R0 e R20 no Exp 1, assim como entre o grupo Q0 e os grupos Q10, Q15 e Q20 no Exp 2 e entre o grupo RQ0 e os Q5 e R10Q5 no Exp 3, o que pode ser benéfico aos espermatozóides, uma vez que o alto PMM parece estar associado a eventos prejudiciais à sobrevivência e ao funcionamento destes gametas, visto que, de acordo com Turrens (2003), o sistema mitocondrial é a principal fonte intracelular de ROS.

Todos os grupos experimentais apresentaram valores de iAC compatíveis com o limite mínimo de 30,00% proposto por Evans e Maxwell (1987) e sem diferença estatística entre os grupos tratados ou não com antioxidantes, embora numericamente a adição de antioxidantes tenha aumentado a integridade desta estrutura ao se adicionar resveratrol (Exp 1: R10, R15 e R20) ou quercetina (Exp 2: Q5, Q10, Q15 e Q20). Apesar desta tendência, os resultados deste estudo contrariam os de SARLÓS et al. (2002), os quais verificaram que o tratamento com antioxidantes (α -tocoferol acetato,

glutathiona peroxidase, aromex[®], resveratrol e suas associações) resultou, estatisticamente, em menor dano espermático e em melhor conservação do sêmen ovino refrigerado. Estes autores observaram que o resveratrol na concentração de 15 µg/10⁹ espermatozoides/mL, um composto previamente não usado para a conservação do sêmen, apresentou-se como um potente antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica e determinando menores decréscimos da motilidade, integridade da membrana e do acrossoma de espermatozoides ovinos em temperaturas de 37 e 5 °C.

Da mesma forma, a não constatação do efeito protetor da quercetina isolada ou em associação ao resveratrol sobre os espermatozoides ovinos criopreservados, contradiz o relato de que a superioridade desses dois antioxidantes fenólicos na supressão da peroxidação lipídica é cientificamente comprovada, especialmente em comparação às vitaminas C e E (STOJANOVIĆ et al., 2001), exercendo efeito sinérgico quando combinados (URQUIAGA e LEIGHTON, 2000). Tais atividades antioxidantes dos compostos fenólicos decorrem, particularmente, de suas propriedades de oxidorredução, podendo estes agentes desempenhar importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, através da quelação ao oxigênio triplete e singlete ou decomposição de peróxidos (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004), com toxicidade mínima (DAVID et al., 2007), o que não ficou bem evidenciado no presente estudo, uma vez que não se constatou melhoria dos parâmetros seminais após criopreservação do sêmen tratado com antioxidantes.

Apesar dos parâmetros seminais não terem sido significativamente melhorados nos grupos tratados com resveratrol e quercetina, em relação ao grupo controle, estes foram mantidos, com exceção do PMM, fato que não é característico da ação dos oxidantes. Isto porque o ataque das células pelas ROS resulta, principalmente, no decréscimo da motilidade espermática (BAUMBER et al., 2000; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006), redução da viabilidade espermática e incremento de defeitos na peça intermediária com efeitos deletérios sobre a capacitação e reação acrossomal dos espermatozoides (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006), o que não foi observado no presente estudo.

A partir do exposto, foram formuladas duas hipóteses para justificar os resultados observados neste estudo. A primeira é de que os antioxidantes tiveram sua ação protetora comprometida, fato que pode ter decorrido de modificações em suas atividades e distribuição, a exemplo do que acontece com as enzimas antioxidantes (SOD, GSH-Px, GSH-Red) presentes em espermatozoides ovinos (MARTI et al., 2008).

Esta suspeita é fortalecida pelo relato de que um dos pré-requisitos para a eficiente atuação dos antioxidantes fenólicos é o tempo de vida do radical a ser interceptado, sabendo-se que as meias-vidas da maioria das ROS diferem entre si (SIES, 1993), como consequência de suas propriedades físicas e químicas (BLAKE et al., 1987), tornando indispensável a existência de diferentes tipos de mecanismos de defesa para combatê-las (SIES, 1993).

Concomitantemente, de acordo com a primeira hipótese, a redução do PMM observada neste estudo teria sido determinada pelo aumento da produção de ROS, as quais são relacionadas com a inibição de uma ou mais enzimas da fosforilação oxidativa (BAUMBER et al., 2000). Entretanto, este processo resultaria na depleção do ATP e insuficiente fosforilação do axonema, peroxidação lipídica e perda da viabilidade (De LAMIRANDE et al., 1997) e, especialmente, da motilidade (LOPES et al., 1998), o que não foi observado. Assim, a segunda hipótese estaria relacionada ao fato de que a redução do PMM poderia ter sido determinada pela ação antioxidante dos compostos fenólicos, uma vez que estes atuam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, agindo nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002).

O fortalecimento desta hipótese se deve ao fato das mitocôndrias serem a principal fonte de ROS intracelular (BLAKE et al., 1987; AGARWAL e SALEH, 2002; TURRENS, 2003; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006), além de ser o local onde ocorre a redução completa do O₂ (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Por conseguinte, as elevadas concentrações de ROS ocasionam ruptura das membranas mitocondriais, ocorrendo eliminação da proteína citocromo-C da mitocôndria que ativa as caspases e induz a apoptose (MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006), de modo que a partir do mau funcionamento desta organela (ORTEGA et al., 2003), a cadeia respiratória pode atuar como um processo de autoxicação (TURRENS, 2003).

Sabe-se que os antioxidantes podem desempenhar importante papel na redução da apoptose durante a espermatogênese, armazenamento e trânsito espermático no trato genital, bem como protegem contra infecções, aumentam a qualidade seminal e reduzem os danos ao DNA espermático (SIKKA, 2004). No entanto, não está totalmente esclarecido se os produtos da peroxidação lipídica da membrana espermática são indispensáveis ou prejudiciais (SANOCKA e KURPISZ, 2004). Deste modo, segundo estes autores, se a peroxidação lipídica for considerada benéfica, a inibição da atividade de antioxidantes endógenos pode ser vantajosa em condições fisiológicas

especiais e a administração de antioxidantes exógenos pode ser inapropriada. Por outro lado, se a peroxidação lipídica inibe ou altera os processos fisiológicos, a intervenção terapêutica pode ser benéfica à fisiologia espermática.

Em geral, embora os parâmetros espermáticos do sêmen ovino criopreservado não tenham melhorado significativamente com a adição dos antioxidantes quercetina e resveratrol, com exceção do PMM, todos os demais parâmetros sofreram melhorias numéricas em relação ao grupo controle, podendo estes agentes antioxidantes representar uma promissora terapia no tratamento de pacientes com problemas reprodutivos. Em contrapartida, para que isto se confirme, bem como, para que sejam esclarecidos os permanentes questionamentos a respeito dos efeitos da adição de antioxidantes ao sêmen, é necessária a realização de novos estudos, com aprofundamento das avaliações espermáticas, especialmente da peroxidação lipídica, a fim de determinar se a adição dos antioxidantes polifenólicos é realmente capaz de controlar a produção dos agentes oxidativos.

Além disto, é de grande importância realizar avaliação *in vivo* para estudar a capacidade fertilizante das células criopreservadas na presença dos antioxidantes resveratrol e quercetina. Este resultado iria contribuir para esclarecer se a redução do PMM, determinada por estes polifenóis, foi decorrente de suas ações protetoras ou não, e, deste modo, se estes agentes possuem efeito maléfico à reprodução animal.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste estudo pode-se concluir que a adição dos antioxidantes fenólicos resveratrol e quercetina, isolados ou em associação, reduz o potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides ovinos submetidos à congelação. Todavia, outros estudos devem ser realizados visando avaliar diferentes concentrações, bem como o efeito da adição destes antioxidantes na taxa de fertilidade de ovelhas inseminadas artificialmente.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão de bolsa de mestrado e suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinics of North America**, v. 29, n. 4, p. 1-12, 2002.
- AITKEN, R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 169-173, 1997.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled- stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.
- BLAKE, D.R.; ALLAN, R.E.; LUNEC, J. Free radicals in biological Systems – a review orientated to inflammatory processes. **British Medical Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 371-385, 1987.
- CARVALHO, F.P.; SILVA, J.F.S.; SOUZA, G.V.; QUIRINO, C.R.; CARVALHO, C.S.P. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 3, p. 612-620, 2008.
- 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.
- DAVID, J.M.P.; DAVID, J.P.; SANTOS, V.L.C.S.; SANTOS, M.L.S.; MOTA, M.D. Resveratrol: ações e benefícios à saúde humana. **Diálogos & Ciência**, ano V, n. 10, p. 1-11, 2007.
- DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Sydney: Butterworths, 1987, 194 p.

- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K.; HELBOCK, H.J.; JACOB, R.A.; AMES, B.N. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 11003-11006, 1991.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.
- GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2089-2100, 2006.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.
- JUAN, M.E.; GONZÁLES-PONS, E.; MUNUERA, T.; BALLESTER, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; PLANAS, J.M. Trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in health rats. **The Journal of Nutrition**, v. 135, p. 757-760, 2005.
- LOPES, S.; JURISICOVA, A.; SUN, J.; CASPER, R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 896-900, 1998.
- MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 80-89, 2006.
- Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ª ed., Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), 1998, 49 p.
- MARQUES, A.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; GOBESSO, A.A.O.; NEVES NETO, J.R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.
- MARTI, E.; MARTI, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidante enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 4, p. 459-467, 2008.

- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5ª ed. Porto Alegre: Livraria Sulina Editora, v. 2, p. 353-783, 1982.
- ORTEGA, A.M.; IZQUIERDO, A.C.; GÓMEZ, J.J.H.; OLIVARES-CORICHI, I.M.; TORRES, V.M.M.; MÉNDEZ, J.J.V. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. **Interciência**, v. 28, n. 12, p. 699-704, 2003.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M. BUSH, L.M.; 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.
- RUIZ, L.; SANTIANI, A.; SANDOVAL, R.; HUANCA W.; DELGADO, A.; CORONADO, L.; ALZAMORA, C. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 18, n. 2, p. 99-106, 2007.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative Stress and Male Infertility: From Research Bench to Clinical Practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.
- SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 12, p. 1-7, 2004.
- SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, GY.; 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.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- STOJANOVIĆ, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 79-89, 2001.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.

URQUIAGA, I.; LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. **Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 55-64, 2000.

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

Tabela 1 - Parâmetros espermáticos de amostras de sêmen de reprodutores ovinos da raça Santa Inês criopreservadas em Tris-gema acrescido de diferentes concentrações de resveratrol

Parâmetros espermáticos	Grupos experimentais				
	R0	R5	R10	R15	R20
MP (%)	50,83 ± 2,04	50,00 ± 10,95	52,50 ± 10,84	50,83 ± 4,92	49,17 ± 6,65
Vigor (0-5)	3,17 ± 0,41	3,33 ± 0,52	3,50 ± 0,55	3,17 ± 0,41	3,33 ± 0,82
iMP (%)	35,83 ± 3,04	37,08 ± 6,18	37,50 ± 10,83	36,00 ± 5,32	36,25 ± 7,34
PMM(%)	36,67 ± 8,01 ^a	27,08 ± 6,46 ^{ab}	27,50 ± 6,95 ^{ab}	31,92 ± 7,72 ^{ab}	22,33 ± 6,16 ^b
iAC (%)	61,42 ± 8,38	61,00 ± 9,73	65,92 ± 6,87	64,17 ± 6,59	65,00 ± 8,58

MP= motilidade progressiva; iMP= integridade da membrana plasmática; PMM= potencial da membrana mitocondrial; iAC= integridade do acrossoma; R0= sem antioxidante (grupo controle); R5= 5µg/mL de resveratrol; R10= 10µg/mL de resveratrol; R15= 15µg/mL de resveratrol; R20 = 20µg/mL de resveratrol. Letras diferentes na mesma linha indicam P<0,05.

Tabela 2 - Parâmetros espermáticos de amostras seminais de reprodutores ovinos da raça Santa Inês criopreservadas em Tris-gema acrescido de diferentes concentrações de quercetina

Parâmetros espermáticos	Grupos experimentais				
	Q0	Q5	Q10	Q15	Q20
MP (%)	50,83 ± 2,04	53,33 ± 10,80	53,33 ± 8,76	45,00 ± 4,47	55,00 ± 8,37
Vigor (0-5)	3,08 ± 0,20	3,50 ± 0,55	3,50 ± 0,55	3,33 ± 0,52	3,83 ± 0,41
iMP (%)	36,25 ± 3,28	39,75 ± 10,24	39,17 ± 9,65	37,33 ± 5,72	35,42 ± 4,44
PMM(%)	36,25 ± 8,12 ^a	20,58 ± 12,05 ^{ab}	9,33 ± 6,54 ^{bc}	6,25 ± 5,98 ^c	5,17 ± 5,08 ^c
iAC (%)	62,25 ± 7,04	66,33 ± 3,72	64,50 ± 5,41	67,75 ± 9,45	64,33 ± 6,22

MP= motilidade progressiva; iMP= integridade da membrana plasmática; PMM= potencial da membrana mitocondrial; iAC= integridade do acrossoma; Q0= sem antioxidante (grupo controle); Q5= 5µg/mL de quercetina; Q10= 10µg/mL de quercetina; Q15= 15µg/mL de quercetina; Q20 = 20µg/mL de quercetina. Letras diferentes na mesma linha indicam P<0,05.

Tabela 3 - Parâmetros espermáticos de amostras seminais de reprodutores ovinos da raça Santa Inês criopreservadas em Tris-gema acrescido de resveratrol e quercetina

Parâmetros espermáticos	Grupos experimentais			
	RQ0	R10	Q5	R10Q5
MP (%)	45,00 ± 12,25	50,83 ± 10,21	47,50 ± 7,58	49,17 ± 8,01
Vigor (0-5)	3,50 ± 0,55	3,67 ± 0,52	3,83 ± 0,41	3,67 ± 0,52
iMP (%)	36,67 ± 6,37	35,41 ± 11,58	38,92 ± 6,79	32,33 ± 8,71
PMM(%)	39,00 ± 16,79 ^a	28,75 ± 8,75 ^{ab}	18,00 ± 13,76 ^b	14,42 ± 7,47 ^b
iAC (%)	73,08 ± 6,73	67,25 ± 9,83	70,58 ± 3,81	72,92 ± 8,77

MP= motilidade progressiva; iMP= integridade da membrana plasmática; PMM= potencial da membrana mitocondrial; iAC= integridade do acrossoma; QR0= sem antioxidante (grupo controle); R20= 20µg/mL de resveratrol; Q10= 10µg/mL de quercetina; R20Q10=20µg/mL de resveratrol + 10µg/mL de quercetina. Letras diferentes na mesma linha indicam P<0,05.

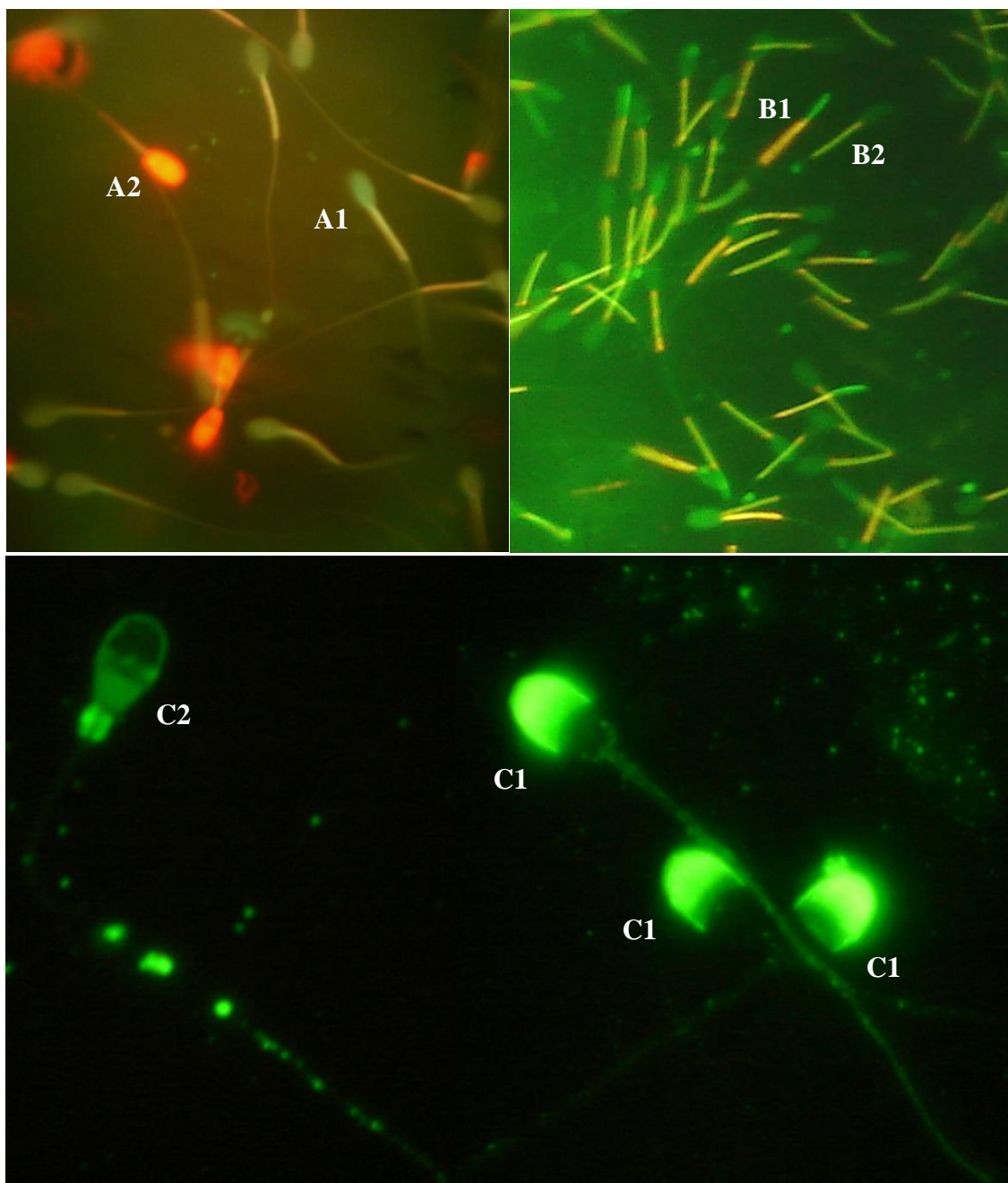


Figura 1 – Espermatozoides ovinos com membrana plasmática íntegra (A1), corada em verde pelo diacetato de carboxifluoresceína (DCF), e lesionada (A2), corada em vermelho pelo iodeto de propídeo (IP); espermatozoides ovinos com alto (B1) e baixo (B2) potencial de membrana mitocondrial corados, respectivamente, em laranja e verde pelo fluorocromo JC-1; espermatozoides ovinos com acrossomas intactos (C1) e reagidos (C2) após coloração com o *fluorescein isothiocyanate-conjugated aglutin* (FITC-PNA).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a criopreservação do sêmen possibilite o desenvolvimento da indústria animal, quando usada em associação à IA, sua utilização na espécie ovina ainda sofre limitações em virtude dos prejuízos que ocasiona às células espermáticas, decorrente de estresse térmico, químico e mecânico a tais estruturas. Como consequência disto, tem-se buscado o aperfeiçoamento desta biotécnica através da busca por crioprotetores que possam substituir o glicerol, assim como a adição de substâncias antioxidantes aos diluidores.

Na espécie ovina, estudos visando encontrar crioprotetores alternativos ao glicerol decorrem da sensibilidade de seus espermatozoides à toxicidade deste agente. Em contrapartida, os resultados obtidos com esses estudos são variados e, em sua maioria, não demonstram superioridade de nenhum crioprotetor em relação ao glicerol, fato que pôde ser confirmado no presente estudo, onde o etileno glicol, embora tenha mantido os parâmetros espermáticos próximos aos do glicerol, não promoveram aumento na qualidade espermática, pós-descongelção.

Com relação às terapias antioxidantes, embora possam representar um importante caminho para a inibição dos danos ocasionados pelas ROS às células espermáticas, é sabido que sofrem a influência de diversos fatores. No caso dos antioxidantes resveratrol e quercetina, utilizados neste estudo, embora não tenham promovido melhoria significativa nos parâmetros seminais, suas ações não caracterizaram efeitos pró-oxidante, visto que, de maneira geral, estes se mantiveram normais e próximos aos dos grupos criopreservados sem antioxidante. Deste modo, é provável que os polifenóis tenham determinado redução do PMM como um mecanismo de defesa, uma vez que as mitocôndrias são as principais fontes endógenas de ROS. Contudo, para a confirmação de tal suspeita, é fundamental a realização de novos estudos a fim de estabelecer a ação destes agentes, especialmente em relação à peroxidação lipídica das membranas.