

LAWRENCE DE OLIVEIRA BARROS

**EFEITO DA ADIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES GLUTATIONA
PEROXIDASE E CISTEÍNA AO DILUIDOR DE CONGELAÇÃO
DO SÊMEN EQUINO**

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2011**

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

**EFEITO DA ADIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES GLUTATIONA
PEROXIDASE E CISTEÍNA AO DILUIDOR DE CONGELAÇÃO
DE SÊMEN EQUINO**

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

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

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2011**

Catálogo na fonte

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central - UFRPE

B277e Barros, Lawrence de Oliveira

Efeito da adição dos antioxidantes glutathione peroxidase e cisteína ao diluidor de congelamento do sêmen equino/ Lawrence Barros – 2011.
59 f. : il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra.

Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2011.

Referências

CDD 636.1 08926

1. Antioxidantes
 2. Espermatozoíde Equino
 3. Criopreservação
- I. Guerra, Maria Madalena Pessoa, Orientadora
 - II. Efeito da adição dos antioxidantes glutathione peroxidase e cisteína ao diluidor de congelamento do sêmen equino.

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

**EFEITO DA ADIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES GLUTATIONA
PEROXIDASE E CISTEÍNA AO DILUIDOR DE CONGELAÇÃO
DO SÊMEN EQUINO**

Dissertação de Mestrado elaborada e defendida por

LAWRENCE DE OLIVEIRA BARROS

Aprovada em 28 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

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

Orientadora

Prof. Dr. Gustavo Férrer Carneiro/UFRPE/UAG

Dra. Karen Mascaro Gonçalves da Silva/UFRPE

Prof. Dr. Pierre de Castro Soares/UFRPE

Dedicatória

Dedico a meus pais, por minha vida e por tudo que sou; à minha mãe pelo AMOR incondicional e minha formação; e aos meus irmãos, pela presença constante em todos os momentos da minha vida e pelo inegável apoio em tudo. E aos cavalos, os quais tenho dedicado minha vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela sua imensa misericórdia por mim, e por tudo o que gratuitamente tem me dado todos os dias da minha vida;

A meu pai, Aluisio Barros Rodrigues (*in memoriam*), pelo exemplo de honestidade, hombridade e amor ao trabalho, que sempre mostrou durante toda a sua vida;

À minha mãe, Rejane de Oliveira Barros, pela vida, pela educação e cultura que me deu, por seu Amor incondicional de mãe, e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos;

Aos irmãos mais amados do mundo: Arthur e Eveline, que sempre estiveram ao meu lado, e, mesmo calados, sabemos o que se passa com cada um de nós;

À minha orientadora, Profa. Maria Madalena Pessoa Guerra, por ter me aceitado como orientado, pela oportunidade de ter cursado o Mestrado, por seus conselhos e orientações. Tenho orgulho de ter trabalho com uma pessoa tão digna como a Sra;

À colega Sildivane, certamente a pessoa que mais me ajudou durante todo o Mestrado, a qual espero um dia poder retribuir toda a atenção e ajuda que recebi;

Aos colegas, André Mariano, Pedro Leopoldo, Felipe Costa, Álvaro e Ellen, pelo companheirismo e ajuda. Vocês me deram o verdadeiro exemplo de “trabalho em equipe”;

Ao Haras RC, pela concessão dos animais, instalações e funcionários, necessários para realização destes experimentos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

aPMM	espermatozóide com alto potencial de membrana mitocondrial
ALH	amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide
ATP	adenosina tri-fosfato
BCF	batimento flagelar cruzado do espermatozóide
CAT	catalase
CASA	Computer-Assisted Spermatozoal Analysis
CRISP	família de proteínas ricas em cisteína
DCF	diacetato de carboxifluoresceína
DNA	ácido desoxiribonucleico
FITC-PSA	isotiocionato de fluoresceína conjugado a aglutinina do <i>Psium sativum</i>
GPx	glutathiona peroxidase
GR	glutathiona reduzida
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IA	inseminação artificial
IAc	integridade de acrossoma
IMP	integridade de membrana
IP	iodeto propídeo
JC – 1	fluocromo catiônico lipofílico
LIN	linearidade
N ₂ L	nitrogênio líquido
NADPH	nicotinamina adenina dinucleotídeo oxidase
MP	motilidade progressiva
O ₂	radical oxigênio
O ₂ ⁻	ânion superóxido
OH	hidroxila
PB	Proteína Bruta
ROS	espécies reativas de oxigênio ou radicais livres
SOD	superóxido desmutase
STR	retilinearidade
VAP	velocidade média do percurso

VCL	velocidade curvilinear
VM	velocidade média
VSL	velocidade em linha reta
VR	velocidade rápida
WOB	índice de oscilação do espermatozóide

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Valores de média e desvio-padrão de integridade de membrana plasmática (IMP), alto potencial de membrana mitocondrial (aPMM) e integridade de acrossoma (IAC) das amostras de sêmen equino congeladas em Botu Sêmen suplementado com GPx e Cisteína, imediatamente após a congelação (T0) e após 60 minutos (T60).....	54
Tabela 2 – Valores de média e desvio-padrão de integridade de membrana plasmática (IMP), alto potencial de membrana mitocondrial (aPMM) e integridade de acrossoma (IAC), por animal, das amostras de sêmen equino congeladas em Botu Sêmen suplementado com GPx e Cisteína, imediatamente após a congelação (T0) e após 60 minutos (T60).....	55
Tabela 3 – Valores de média e desvio-padrão da cinética de espermatozoides equinos submetidos a congelação após diluição em Botu Crio (controle), suplementados com GPx e cisteína, imediatamente após a descongelação T0 e após 60 minutos (T60).....	56
Tabela 4 – Valores de média e desvio-padrão da cinética, por animal, de espermatozoides equinos submetidos a congelação após diluição em Botu Crio (controle) suplementado com GPx e cisteína, imediatamente após a congelação (T0) e após 60 minutos (T60).....	57
Tabela 5 – Coeficiente de Correlação de Pearson entre os parâmetros do sêmen equino submetido a congelação após diluição em Botu Crio (controle) suplementado com GPx e cisteína.....	58

RESUMO

A criopreservação de sêmen equino representa uma importante biotécnica aplicada ao manejo reprodutivo desta espécie. Quando exposto a baixas temperaturas, os espermatozoides sofrem modificações estruturais, ocorrendo estresse oxidativo quando há desequilíbrio entre a produção de ROS e a quantidade de substâncias antioxidantes presentes no plasma seminal. Objetivando-se analisar o efeito da adição de diferentes concentrações de glutathione peroxidase (GPx) e cisteína ao diluidor de congelamento do sêmen de equinos, foram utilizados cinco garanhões da raça Quarto-de-Milha, com fertilidade comprovada. Amostras de sêmen foram colhidas com vagina artificial e diluídas em Botu Crio, acrescido de antioxidantes: G1= Controle (Sem antioxidantes); G2= 0,5 mM de N-Acetil-Cisteína; G3= 1 mM de N-Acetil-Cisteína; G4 = 1 U de Glutathione Peroxidase (GPx) e G5= 5 U de Glutathione Peroxidase (GPx). A seguir, as amostras de sêmen foram envasadas em palheta (0,5 mL; na concentração de 150×10^6 espermatozoides/palheta), congeladas utilizando o método automatizado e armazenadas em botijão criogênico à -196°C . As amostras foram descongeladas (37°C por 30 segundos) e submetidas às análises espermáticas (cinética, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e potencial de membrana mitocondrial), imediatamente após a descongelação (T0) e após 60 minutos (T60). Amostras de sêmen suplementadas com GPx 5 U e cisteína 0,5 mM não apresentaram diferenças ($P>0,05$) na porcentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial, assim como com acrossomas e membrana plasmática íntegras, entre os tempos T0 e T60. Amostras congeladas com cisteína 1 mM apresentaram maior ($P<0,05$) porcentual de gametas com acrossomas íntegros do que os de GPx 1 e 5 U e cisteína 0,5 mM. Espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial foram encontrados no T60 em maior ($P<0,05$) porcentual no garanhão 5 em relação aos garanhões 1 e 2. A cinética espermática evidenciou maiores ($P<0,05$) valores de VCL e VAP nas amostras controle, no T0 do que no T60. De maneira geral, o cavalo 4 apresentou maiores ($P<0,05$) valores cinéticos que os demais animais. Conclui-se que a adição de cisteína 1mM preservou melhor a integridade de acrossoma espermático, e que a resposta individual de cada garanhão influencia significativamente os resultados dos parâmetros analisados.

Palavras-chave: antioxidantes, espermatozóide equino, criopreservação.

ABSTRACT

The cryopreservation of equine semen represents an important applied reproductive biotechnology of this species. When exposed to low temperatures, spermatozoa suffer structural modifications, occurring oxidative stress when there is imbalance between the production of reactive oxygen species (- ROS) and the amount of antioxidants present in seminal plasma. The objective of this study was to analyze the effect of the addition of different concentrations of the antioxidants glutathione peroxidase (GPx) and cysteine in equine frozen semen medium. Five Quarter Horse stallions, with proven fertility were used. Semen samples were collected with artificial vagina and diluted in Botu Crio added with antioxidants: G1= Control (without antioxidants); G2= 0.5 mM of N-Acetil-Cysteine; G3= 1 mM of N-Acetil-Cysteine; G4 = 1 U of Glutathione Peroxidase (GPx) and G5= U of Glutathione Peroxidase (GPx). Semen samples were packed straws (0.5 mL; 150×10^6 concentration of spermatozoa/straw), frozen in automated method and stored in liquid Nitrogen ($-196\text{ }^\circ\text{C}$). Semen samples were thawed ($37\text{ }^\circ\text{C}$ per 30 seconds) and submitted to sperm analyses (kinematic, plasma membrane and acrosome integrity, and potential of mitochondrial membrane), immediately after thawing (T0) and after 60 minutes (T60). Semen samples supplemented with GPx 5 U and cysteine 0.5 mM did not show difference ($P>0.05$) on the percentage of sperms with high percentage of potential of mitochondrial membrane, as well as with intact acrosome and plasma membrane between T0 and T60 times. Frozen samples with cisteine 1 mM showed high ($P<0.05$) of gametes with intact acrosome than those of GPx 1 and 5 U and cisteine 0.5mM. Spermatozoa with higher percentage of potential of mitochondrial membrane was founded in T60 ($P<0.05$) in stallion 5 than stallions 1 and 2. The sperm kinematic evidenced a high values of VCL and VAP ($P<0.05$) in control samples, in T0 than T60. In general, the stallion 4 presented high values ($P<0.05$) of kinematic parameters than other stallions. It can be concluded that addition of cysteine (1mM) in equine frozen semen medium preserved better the acrosome integrity and that the individual response of each stallion influence significantly the results of the sperm analysis.

Keywords: antioxidants, equine spermatozoa, cryopreservation.

SUMÁRIO

Página

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
4 EXPERIMENTO.....	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen equino representa uma importante biotécnica aplicada ao manejo reprodutivo desta espécie (BALL et al., 2001). Suas vantagens são potencializadas, quando associada à Inseminação Artificial (IA), por otimizar o uso de garanhões durante a Estação de Monta, reduzir os riscos de acidentes durante o transporte dos animais, possibilitar o comércio intercontinental de coberturas e reduzir a transmissão de doenças venéreas (SAMPER, 2009).

Porém, durante anos, o uso desta biotécnica foi reduzido, devido a restrições ao uso de sêmen congelado por parte de algumas associações de criadores, bem como pela diminuição da capacidade fertilizante do sêmen pós-descongelamento, decorrente da redução da viabilidade e da longevidade celular (BALL et al., 2001). Destaca-se ainda a necessidade de pessoal capacitado, indução da ovulação, controle rigoroso da atividade ovariana e inseminação realizada no momento mais próximo possível da ovulação, e por apresentar índices reprodutivos menores que os resultados obtidos com uso do sêmen fresco ou resfriado, tornou o uso do sêmen congelado restrito e oneroso (SQUIRES et al., 2000; SAMPER, 2009; McKINNON 2010).

Na congelamento, quando exposto a baixas temperaturas, os espermatozoides sofrem modificações estruturais como formação de cristais de gelo e elevação da concentração de solutos intracelulares, aumento da permeabilidade e, conseqüentemente, ruptura da membrana plasmática (HOLT, 2000). Em condições de estresse, o espermatozoide produz maior quantidade de espécies reativas ao oxigênio (ROS), causando estresse oxidativo e resultando em danos ou morte celular (BALL, 2008), devido a danos na membrana celular, reduzindo a motilidade e a longevidade espermática ou pelo aumento da produção de ROS, causando danos diretos ao DNA espermático (fragmentação), comprometendo a transmissão do material genético do garanhão (REGHINI et al., 2010).

O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de ROS e a quantidade de substâncias antioxidantes presentes no plasma seminal (SALEH e AGARWAL, 2002), podendo ocasionar lesões na membrana plasmática, decorrentes da peroxidação lipídica de membrana (BALL et al., 2002), assim como inibição do metabolismo celular (WANG et al., 2003, da motilidade e da capacidade fertilizante dos espermatozóides (AGARWAL e SAID, 2005).

Durante a congelação, o sêmen equino induz o aumento da produção de ROS e a redução das concentrações de antioxidantes pela retirada do plasma seminal (BAUMBER et al., 2005). Por outro lado, na descongelação, os danos oxidativos são causados pelo rápido aumento do consumo de oxigênio pelos espermatozóides, em resposta à interrupção do metabolismo, aumentando a produção de radicais livres (BALL et al., 2002).

Vários estudos têm demonstrado efeitos benéficos da administração de substâncias antioxidantes, por via oral ou pela adição ao meio de congelação de sêmen, visando prevenir *in vitro* e *in vivo* os efeitos deletérios da elevada produção de ROS (PONS-REJRAIJ et al., 2009). Os antioxidantes presentes no espermatozóide e no plasma seminal interferem na concentração de ROS, inibindo a sua formação e ação, atuando de forma independente ou sinérgica com outras substâncias (LEWIS et al., 1997; AURICH, 2008). Diversos autores reportaram os efeitos benéficos da adição de antioxidantes na dieta de garanhões, assim como a adição de antioxidantes em meios de diluição de sêmen equino. Alguns antioxidantes lipossolúveis e aquosos, como catalase, pentoxifilina, tempol, tocoferol, vitamina E, glutathione peroxidase, cisteína e ácido ascórbico têm sido usados em diversas espécies, demonstrando melhoria na preservação da longevidade e da fertilidade espermática.

Assim objetivou-se com este trabalho analisar o efeito da adição de antioxidantes (glutathione peroxidase e cisteína) ao diluidor de congelação do sêmen de equino sobre a viabilidade espermática *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Célula Espermática

O espermatozoide é o gameta masculino formado nos túbulos seminíferos dos testículos à partir de células germinativas e sofrem diversas modificações (MIES FILHO, 1982). O espermatozoide é composto por cabeça, colo e cauda. A cabeça do espermatozoide equino é achatada e larga, compreendendo núcleo e acrossoma, onde está a cromatina condensada, o DNA e a protamina, proteína associada ao DNA espermático (HAFEZ, 2004). O acrossoma contém, em seu interior, glicoproteínas, enzimas hidrolíticas (p.ex.: fosfolipase A, acrossina, hialuronidase) e outras enzimas, essenciais para a lise da zona pelúcida e a penetração da *corona radiata* do oócito (MANN e LUTWAK-MANN, 1981; PRESCH e BERGMANN, 2006).

A cauda é formada pela peça intermediária, envolta pela bainha de mitocôndrias e tem forma de espiral dupla, peça principal, e peça final. As estruturas que formam a cauda são axonema, bainha de mitocôndrias, que contém enzimas e co-fatores necessários para o metabolismo espermático, visando a produção de ATP (HAFEZ, 2004; VARNER, 2007), e bainha fibrosa externa, a qual contém o axonema em seu interior. O axonema ou filamento axial é composto por dois microtúbulos centrais, circundados por nove microtúbulos duplos (EDDY, 1988), responsável pela força propulsiva, que confere motilidade ao espermatozóide (SILVA e GADELLA, 2006; VARNER, 2007), recoberto pela membrana plasmática (HAFEZ, 2004).

2.1.1 Membrana plasmática

A membrana plasmática do espermatozóide possui uma camada composta por lipídeos, ricos em ácidos graxos poliinsaturados e proteínas, que regulam a função celular (HAMMERSTEDT et al., 1990). A composição da membrana plasmática está relacionada com a capacidade do espermatozóide em suportar as alterações decorrentes da criopreservação, uma vez que, devido à presença de ácidos graxos insaturados, como o colesterol, torna-se vulnerável aos danos oxidativos (AMANN, 1991). Este lipídeo está relacionado à maior resistência a congelação (AMMAN e PICKETT, 1987), pois

atua estabilizando e diminuindo a temperatura na qual a membrana altera seu estado líquido para gel (KIRK et al., 2001).

Na espécie equina, a membrana plasmática dos espermatozóides possui pequena quantidade de colesterol, responsável por estabilizar esta membrana e diminuir a temperatura na qual a membrana sofre a mudança de fluida-cristalina para gel durante a congelação (KIRK et al., 2001), resultando em maior sensibilidade ao choque térmico durante o processo de congelação (SHARMA e AGARWAL, 1996).

2.1.2 Plasma seminal

O plasma seminal é composto de secreções produzidas nos testículos, epidídimos e glândulas sexuais, sendo liberado em frações no momento da ejaculação (VARNER, 2007; KARESKOSKI e KATILA, 2008). No plasma seminal estão presentes diversos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos de origem epididimária, como a glicerilfosforilcolina, que participa do metabolismo de lipídios e da maturação espermática (MAGESTRINI et al., 1996), e proteínas ricas em Cisteína (*Cysteine-rich protein family* – CRISP), que inibem a fosforilação da Tirosina e participam da capacitação espermática, bloqueando os canais de íons na membrana plasmática (VARNER, 2007).

Os efeitos deletérios do plasma seminal são observados em garanhões que possuem baixa tolerância à manutenção do sêmen refrigerado (BRINSKO et al., 2000), onde a motilidade espermática e a integridade do DNA se mostraram superior quando o plasma seminal foi totalmente removido (KARESKOSKI e KATILA, 2008). Todavia, em períodos inferiores a 24 horas, o plasma seminal não alterou a motilidade dos espermatozoides (MOORE et al., 2005). Entretanto, em amostras contendo de 5 – 20% de plasma seminal, a motilidade foi mantida por períodos de até 72 horas, quando o sêmen foi refrigerado à 5 °C com diluente à base de leite desnatado, gema de ovo e glicose (JASKO et al., 1991).

2.2 Criopreservação de Sêmen Equino

Em 1957, Barker e Gandier congelaram sêmen obtido da cauda do epidídimo de um garanhão usando diluidor à base de leite contendo 10% de glicerol e obtiveram o nascimento de um produto após inseminarem sete éguas. Porém, mesmo com a

melhoria no processamento de congelação de sêmen, o interesse pelo uso da Inseminação Artificial (IA) em equinos com sêmen congelado ainda é restrito, provavelmente pelos índices reprodutivos que ainda não são satisfatórios (MORRIS, 2006).

O sucesso no processo de criopreservação de sêmen de garanhões depende de uma série de interações entre o método de congelação, o meio de congelação e crioprotetor, a variabilidade na qualidade do sêmen entre garanhões e entre ejaculados, e a análise do sêmen pós-descongelação (SQUIRES et al., 1999). Para que o espermatozoide fertilize o oócito são necessários alguns atributos após a congelação, como: metabolismo para produção de energia; motilidade progressiva; integridade de acrossoma, onde estão as enzimas que são necessárias para penetração do espermatozoide pelas estruturas que circundam o oócito e membrana plasmática íntegra, onde estão proteínas que interagem na fusão espermatozoide-oócito. Entretanto, qualquer alteração observada nestes atributos reduz ou elimina a capacidade fertilizante dos espermatozoides (AURICH, 2008).

Os danos causados aos espermatozoides podem ter início ainda na fase de coleta e refrigeração do sêmen (5 °C), que se for realizada de forma inadequada, pode determinar a ocorrência de choque térmico, que induz a formação de danos irreversíveis no espermatozoide, caracterizados por motilidade alterada, danos a membrana plasmática e acrossoma, e redução do metabolismo espermático, o que reflete em danos observados durante as fases do processo de congelação (SQUIRES et al., 1999).

Esses danos ocorrem durante a congelação e podem ser causados pelas baixas temperaturas as quais são submetidos, com formação de cristais intracelular, aumentando a concentração intracelular, afetando estruturalmente as organelas (ruptura de membrana) ou alterando o metabolismo celular (HOLT, 2000), induzido pela excessiva permeabilidade da membrana. A composição lipídica da membrana plasmática é um dos fatores que contribuem para a diminuição da resistência do espermatozoide equino às baixas temperaturas durante a congelação (AMMAN e GRAHAM, 1992).

Alguns eventos que ocorrem durante o processo de congelação podem ser críticos para as funções fisiológicas dos espermatozoides após a descongelação, sendo a motilidade no lúmen uterino dependente da disponibilidade de energia e da preservação do acrossoma pós-descongelação. O choque térmico durante a congelação causa perda

irreversível da função mitocondrial, apontada como a principal causa da redução da qualidade espermática (SCHOBER et al., 2007).

2.2.1 Métodos de congelação de sêmen equino

O método desenvolvido por Martin et al. (1979) tem sido ao longo dos anos o mais aplicado para congelação de sêmen equino em trabalhos de campo (VIDAMENT et al., 2001). O sêmen é colhido por vagina artificial, analisado quanto aos parâmetros macroscópicos (volume, cor, aspecto) e microscópicos, como cinéticos (motilidade, motilidade progressiva, vigor) e concentração, sendo em seguida diluído na proporção 1:1 (sêmen:diluidor) com meio de centrifugação (leite desnatado + glicose + antibióticos) (KENNEY, 1983), centrifugado (400 g por 10 minutos) duas vezes e sendo desprezado o sobrenadante. O “pellet” é então ressuspendido com o meio de congelação e o sêmen envasado em palhetas de 0,50 mL. As palhetas são colocadas em caixa isotérmicas contendo nitrogênio líquido (N₂) a uma altura de 3 cm, sob uma “rampa de congelação” por 10 minutos, quando são definitivamente mergulhadas em N₂L.

No entanto, protocolos usando máquinas de congelação de sêmen e palhetas de 0,25 mL mostraram-se mais eficientes na curva de congelação e, conseqüentemente, menor variabilidade no resultado final, devido à menor superfície de congelação da palheta. Todavia, o uso de máquinas de congelação apresenta-se restrito pelo valor de mercado do equipamento (CLULOW et al., 2008; TERRACIANO et al., 2008; JULIANI et al., 2009).

2.2.2 Meios de congelação de sêmen

Os primeiros meios de congelação de sêmen equino baseavam-se nos trabalhos de cientistas japoneses e tinham como composição básica os componentes glicose + lactose + gema de ovo, sem a presença de agente crioprotetor (SQUIRES et al., 1999). Após a introdução de agentes crioprotetores, como glicerol, diversos meios de congelação foram elaborados, tendo como base lactose-EDTA e glicerol (MARTIN et al., 1979), leite + gema de ovo + vários tipos de açúcares e glicerol, como o INRA 82 (PALMER, 1984). Na última década, o uso de formamidas (dimetilformamida e metilformamida) como crioprotetores, determinou novas modificações aos meios de

congelamento, como o uso associado das formamidas ao glicerol (PAPA et al., 2002; MELO et al., 2007).

A definição de um “meio de congelamento ideal” é variável, devendo-se levar em consideração variáveis individuais dos animais quanto à congelabilidade do sêmen com determinado tipo de diluente, o método de congelamento e o envase, assim como a análise do sêmen pós-descongelamento (SQUIRES et al., 1999).

2.2.3 Crioprotetores

Os crioprotetores são substâncias adicionadas ao meio de congelamento de sêmen, a fim de proteger os espermatozoide durante o processo de congelamento (PALMER, 1984). Concentração elevada de crioprotetor no meio de congelamento pode causar danos aos espermatozoide, pela toxicidade e pelo aumento da osmolaridade da membrana plasmática (SQUIRES et al., 2004).

O glicerol é o crioprotetor mais usado na congelamento de sêmen equino (SQUIRES et al., 1999). O alto peso molecular e a viscosidade conferem a este crioprotetor a capacidade de difundir-se lentamente através da membrana plasmática, reduzindo a temperatura do ponto de congelamento (HOLT, 2000) e a concentração de sais e solutos intracelulares (SQUIRES et al., 2004).

No entanto, o glicerol apresenta toxicidade para o espermatozoide, que resulta em desnaturação proteica, alteração na interação da actina, e indução da abertura de canais na membrana, o que, conseqüentemente, aumenta a osmolaridade da membrana, alterando o metabolismo celular por mudanças no citoplasma, devido ao aumento da viscosidade intracelular do glicerol, alterando a polimerização da tubulina e associação dos microtúbulos, modificando o balanço energético da célula espermática, o que contribui para explicar a variação na congelamento do sêmen de alguns animais (HOLT, 2000; VIDAMENT et al., 2001; GOMES et al., 2002; SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA et al., 2005; SHOBER et al., 2007).

O uso das amidas (dimetilformamida e metilformamida) como crioprotetores penetrantes tem-se difundido nos últimos anos, mostrando ótimos resultados na congelamento de sêmen de animais (ALVARENGA et al., 2000; GRAHAM, 2000; GOMES et al., 2002; PAPA et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002; ALVARENGA et al., 2005). Estas substâncias, por terem baixo peso molecular e toxicidade mínima, provocam menor dano osmótico aos espermatozoides, em comparação aos

criopreservados em glicerol (ALVARENGA et al., 2005), reduzindo a variação das características espermáticas pós-descongelção em ganhões considerados “maus congeladores” (Motilidade Progressiva pós-descongelção $\leq 30\%$) (GOMES et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002). No entanto, a associação de glicerol e amidas mostrou-se mais eficiente na manutenção da motilidade pós-descongelção, quando comparado ao uso isolado destes crioprotetores (MEDEIROS et al., 2002). Resultados semelhantes foram obtidos na congelção de smen de coelhos, onde a motilidade pós-descongelção foi mantida (HANADA e NAGASE, 1980), diferente da baixa motilidade pós-descongelção de smen de humanos e caprinos, criopreservados em meio contendo dimetilformamida (WILMUT e POLGE, 1977).

3 Radicais Livres e Estresse Oxidativo

Os espermatozoides podem produzir quantidades endógenas e controladas de ROS que, em quantidades normais, induzem a capacitação, a hiperativação espermática e a reação acrossomal, aumentando a capacidade fertilizante destes gametas (De LAMIRANDE e GAGNON, 1995; RIVLIN et al., 2004). A ação fisiológica das ROS pode ser verificada ainda na sinalização celular e regulação redox, utilizando o radical superóxido e peróxido de hidrogênio, atuando na atividade de várias quinases, fatores de transcrição e morte celular (BURNAUGH et al., 2010). Além disso, vários citocininas, fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores usam as ROS como segundo mensageiro (IMAI e NAKAGAWA, 2003) e no transporte de elétrons da cadeia respiratória, atuando como moléculas sinalizadoras (ANDRADE et al., 2010).

Fisiologicamente, o metabolismo celular aeróbio reduz, através do citocromo oxidase mitocondrial, o oxigênio molecular (O_2) em gua (H_2O) (BERGENDI et al., 1999). Porém, cerca de 5% do O_2 da cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido em H_2O , sendo convertido em reativos intermediários como Superóxido (O_2^-), hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (COHEN, 1989).

Todavia, ressalta-se que, quando há produção excessiva de ROS, ocorre redução da motilidade espermática (GUERRA et al., 2004), peroxidação da membrana lipídica (BALL e VO, 2002), inibição do metabolismo celular (WANG et al., 2003) e, conseqüentemente, redução da longevidade e da capacidade fertilizante dos espermatozóides (PASQUALOTTO et al., 2000; GUERRA et al., 2004; AGARWAL e SAID, 2005; AURICH, 2008). O efeito prejudicial das ROS ao espermatozóide foi

demonstrado por MacLeod (1943), que expôs o espermatozóide humano, a altas concentrações de oxigênio, resultando em rápida perda da motilidade espermática.

No ejaculado, há duas fontes principais de ROS: o espermatozóide e o leucócito, que tem mecanismo similar de geração de ROS, à partir da nicotinamina adenina dinucleotídio oxidase (NADPH) presente na membrana. Contudo, as ROS produzidas pelos leucócitos, durante a fagocitose, podem ser bastante prejudiciais à função espermática (BURNAUGH et al., 2010).

A ROS produzida inicialmente pelos espermatozóides é o ânion Superóxido (O_2^-), que sofre uma reação mediada pela superóxido dismutase, presente no plasma seminal, formando o peróxido de hidrogênio, o qual é mais tóxico que o O_2^- , causando peroxidação lipídica da membrana plasmática (SALEH e AGARWAL, 2002) e perda do ATP do axonema da cauda (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1992). Os danos oxidativos nos espermatozóides de homens (GRIVEAU et al., 1995), são responsáveis pela subfertilidade determinada pela redução da capacidade antioxidante do sêmen (LEWIS et al., 1997).

Em pacientes com infertilidade idiopática, portadores de infecções genitais, teratozoospermia e azoospermia foram observados redução das defesas antioxidantes e conseqüente aumento na produção de ROS (AGARWAL e SAID, 2005), devido à maior produção de ROS pelos espermatozóides anormais ou não funcionais, em comparação aos espermatozóides normais (ZINI et al., 2000).

O DNA mitocondrial é muito susceptível ao H_2O_2 , sendo o espermatozoide equino susceptível à fragmentação do DNA induzida pelas ROS (VARNER, 2007). Nos espermatozóides bovinos, o aumento na produção de ROS durante a criopreservação eleva o nível de peroxidação lipídica, associada com o aumento da rigidez na porção hidrofóbica da membrana espermática, reduzindo a motilidade e a capacidade fertilizante do sêmen, devido à capacitação espermática precoce e descondensação nuclear (CHATTERJEE e GAGNON, 2001).

O processo de congelamento induz a maior produção de ROS, devido, principalmente, à remoção do plasma seminal (BALL, 2008) e pela rápida fase de transição do estado líquido para o estado gel (CHATTERJEE e GAGNON, 2001), enquanto, na descongelamento, os danos oxidativos são causados pelo rápido aumento do consumo de oxigênio pelos espermatozoides, após a interrupção do metabolismo celular, ocasionando maior produção de ROS (BALL et al., 2001; BALL e VO, 2002). O estresse oxidativo ocorre como conseqüência do metabolismo celular de tipos

específicos de células, como espermatozoides ou leucócitos, e apresenta-se como fator importante da interrupção da função espermiática (BALL, 2008).

4 Antioxidantes

Os antioxidantes são inibidores das ROS, presentes no espermatozóide e no plasma seminal, que atuam na, de forma independente ou sinérgica (LEWIS et al., 1997; AURICH, 2008). Diversos autores já reportaram os efeitos benéficos da adição de antioxidantes na dieta de garanhões, assim como em meios de diluição de sêmen eqüino, visando prevenir *in vitro* e *in vivo* os efeitos deletérios da elevada produção de ROS (PONS-REJRAIJ et al., 2009).

Dentre as enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal e no espermatozoide estão superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR). A SOD tem como principal função a defesa do espermatozóide contra o íon peróxido, acelerando a dismutação deste íon e formando H_2O_2 (SALEH e AGARWAL, 2002). A CAT é uma enzima derivada das secreções prostáticas, auxilia na neutralização dos efeitos deletérios do H_2O_2 *in vitro* (BALL et al., 2001) e na melhoria da motilidade e viabilidade do espermatozoide bovino, quando adicionada ao diluente de congelação (BILODEAU et al., 2002). Além disso, o fluído do oviduto contém CAT suficiente para proteger o espermatozoide de injúrias oxidativas (VARNER, 2007).

A GPx é uma enzima que atua removendo o H_2O_2 , reduzindo-o a água, sendo considerada um dos principais mecanismos de defesa antioxidante (WENDEL, 1981). A redução na quantidade de GPx está relacionada à infertilidade em homens (). Nos bovinos, a função da vesícula seminal tem influência sobre a atividade da GPx, determinando a baixa fertilidade do sêmen (BAUMBER et al., 2005), enquanto nos eqüinos verificou-se correlação positiva entre motilidade e integridade de membrana e a presença de GPx e CAT, indicando que estes antioxidantes contribuem para o aumento inicial destes parâmetros espermiáticos (PAGL et al., 2006). A GPx catalisa a redução do H_2O_2 , convertendo GSH a Glutaciona Oxidada ou Dissulfito (GSSG). Além disso, a GPx4, um dos quatro tipos de GPx em mamíferos, atua como enzima ativa na espermiática, participando da condensação da cromatina espermiática, bem como pode reagir com o H_2O_2 , sendo considerada responsável pela proteção da membrana contra danos oxidativos (JELEZARSKY et al., 2008).

Os antioxidantes também podem ser adicionados a dietas ou em meios de refrigeração ou congelamento de sêmen e previnem ou retardam a oxidação (VARNER, 2007). O ácido ascórbico atua sinergicamente com a vitamina E (alfa-Tocoferol), protegendo a membrana plasmática, reduzindo a produção de ROS induzida pelo H₂O₂ e evitando danos ao DNA espermático (ALMEIDA e BALL, 2005). Quando adicionado ao meio de refrigeração de sêmen, o ácido ascórbico aumenta a porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra sem, contudo, influenciar na melhoria da motilidade (AURICH et al., 1997).

A adição de vitamina E na dieta de garanhões tem efeito positivo na manutenção da motilidade do sêmen refrigerado (5 °C) após 48 horas (GEE et al., 2008), e quando adicionada ao meio de congelamento, melhora a motilidade progressiva e a integridade das membranas dos espermatozoides de gatos (THUWANUT et al., 2008). São ainda substâncias antioxidantes não enzimáticas a taurina, hipotaurina, albumina, carnitina e piruvato (VARNER, 2007).

A Cisteína (N-Acetil-L Cisteína) é um antioxidante não enzimático, sintetizada na região proximal do epidídimo (COHEN et al., 2007), e, em particular nos equinos, está presente nas secreções da ampola do ducto deferente e da vesícula seminal (SCHAMBONY et al., 1998). Esta proteína está envolvida nos processos de espermatogênese, maturação espermática, fusão oócito-espermatozoide e, possivelmente, na penetração do espermatozoide na zona pelúcida (UDBY et al., 2005). A família das proteínas ricas em Cisteína (CRISP) inibe a fosforilação da tirosina no processo de capacitação espermática, pelo bloqueio dos canais de íons na membrana plasmática (VARNER, 2007). A Cisteína apresenta capacidade de penetrar através das membranas celulares e atuar como antioxidante, de forma direta ou participando da biosíntese intracelular da GSH (REGHINI et al., 2010)

Diversos estudos com sêmen de bovinos (SARIOZKAN et al., 2009), cães (MICHAEL et al., 2008), gatos (THUWANUT et al., 2008) e humanos (UDBY et al., 2005; COHEN et al., 2007; SAFARINEJAD e SAFARINEJAD, 2009) demonstraram que a cisteína oferece proteção efetiva da integridade funcional do acrossoma e da mitocôndria, melhorando a motilidade (SARIOZKAN et al., 2009) e a integridade da membrana espermática pós-descongelamento (PAGL et al., 2006), sem eliminar a presença de ROS (MICHAEL et al., 2008). Em suínos, a adição de cisteína ao meio de maturação melhorou a maturação e a fertilização dos oócitos, bem como a taxa de prenhez (SARIOZKAN et al., 2009).

5 Danos Causados pela Congelação

A redução da capacidade fertilizante do sêmen criopreservado tem sido atribuída à menor motilidade espermática e a ocorrência de grandes porcentuais de alterações morfológicas, como danos ao acrossoma, membrana plasmática e aumento da concentração de ROS livre, elevando os danos ao DNA, induzindo as criopatologias (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2007). O axonema também é danificado durante a congelação, pois as proteínas dos microtúbulos sofrem despolimerização e repolimerização durante a congelação e descongelação, o que pode explicar o fato do espermatozóide manter a motilidade por um curto período de tempo (AMMAN, 1991).

A manipulação do sêmen equino para refrigeração ou congelação determina significativo aumento da fragmentação do DNA (HOLT, 2000). O desenvolvimento das técnicas de avaliação dos danos da criopreservação ao DNA espermático é resultado dos estudos com sêmen de humanos, bovinos e caprinos, evidenciando uma intrínseca relação entre a fragmentação do DNA e a infertilidade (SALEH e AGARWAL, 2002).

Os danos causados à membrana mitocondrial reduzem a fertilidade do sêmen, ocasionando a diminuição da motilidade espermática, uma vez que o aporte energético para movimentação do espermatozóide é fornecido por estas organelas (SHOBER et al., 2007).

6 Métodos de Análise de Sêmen Pós-descongelação

Na rotina de análise de sêmen para a predição da capacidade fertilizante dos espermatozoides equinos, utilizam-se os parâmetros de concentração, motilidade subjetiva e porcentual de patologias espermáticas, apesar destes testes serem limitados e não corresponderem à habilidade de fertilização destes gametas (CAVALCANTE et al., 2005). Desta forma, técnicas mais precisas são necessárias para estimar com maior repetibilidade e confiabilidade a capacidade fertilizante dos espermatozoides equinos pós-descongelação. Por conseguinte, diante da necessidade de estabelecer padrões para a utilização dos parâmetros de motilidade, reduzindo a subjetividade na avaliação, sistemas automáticos de análise seminal (CASA) foram desenvolvidos, fornecendo maior confiabilidade e velocidade na obtenção de dados (MATOS et al., 2008).

Os parâmetros fornecidos por este equipamento são: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e índice de

oscilação ou wobble (WOB), expressos em porcentual; velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP), expressos em $\mu\text{m/s}$; frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), expresso em Hertz; amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH), expresso em micrômetros (MORTIMER, 1990; VERSTEGEN et al., 2002).

Para a avaliação de integridade das membranas espermáticas, diferentes métodos foram desenvolvidos visando determinar suas funções ou preservação estrutural. Esfregaços úmidos de sêmen podem ser examinados por microscopia de contraste de fase após a fixação em glutaraldeído, formol-salino ou formol-citrato, com o objetivo de manter as características celulares e permitir futuras observações, analisando 200 células, no mínimo (MIES FILHO, 1982). Diversos corantes podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto para facilitar a visibilização de estruturas da célula espermática, assim como determinar a sua preservação.

Segundo Rodríguez-Martínez et al. (1997), o desenvolvimento de técnicas de coloração celular utilizando a fluorescência como sondas para DNA, enzimas intracitoplasmáticas, lectinas ou potencial de membrana tem sido apontados como nova ferramenta para a avaliação da funcionalidade do espermatozoide após a congelação-descongelação. As sondas fluorescentes ou fluoróforos monitoram a funcionalidade e/ou a integridade das estruturas espermáticas, as quais possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo diagnóstico prático e direto (CELEGHINI et al., 2007).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; SAID, T.M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: A clinical approach. **Biology Journal**, v. 95, p. 503 – 507, 2005.

ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effect of alfa-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v. 87, p. 321 – 337, 2005.

ALVARENGA, M.A.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, E.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 11, Stockholm, 2000. **Proceedings...** p. 73 (Abstract). 2000.

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

AMMAN, R.P. Fertility of cryopreserved sperm, **Fertility and Sterility**. v. 19, p. 946 – 954, 1991.

AMMAN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L., **Equine Reproduction**, Phyladelphia: Lea e Febriger, p. 715 – 745. 1992.

AMMAN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145 – 173, 1987.

ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79 – 85. 2010.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3 – 4, p. 268 – 275, 2008.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 260 – 267, 2008.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability, and acrosomal integrity of equine spermatozoa during store at 5 degrees C. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 577-589, 2001.

- BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Veterinary Research Journal**, v. 62, n. 4, p. 508-515, 2002.
- BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal Comp. Medicine**. v.21, p. 47 – 51, 1957.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **Animal Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 772 – 779, 2005.
- BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, v. 65. p. 1865 – 1874, 1999.
- BILODEAU, J.F. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by piruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, p. 1105 – 1122. 2002.
- BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partialremoval of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p. 129 – 136, 2000.
- BURNAUGH, L.; BALL, B.A.; SABEUR, K.; THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 249 – 260, 2010.
- CAVALCANTE, T.V.; ESPER, C.R.; FERREIRA, J.L.; DIAS F.E.F.; AZEVEDO, H.C.; CORDEIRO, M.F.; SOUZA, J.A.T. Avaliação da atividade mitocondrial em espermatozoides pós-colheita e pós-descongelção de caprinos das raças Boer e Alpina no outono e primavera. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 89-93, 2005.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 42, p. 479-488, 2007.
- CHATEERJEE, S.; GAGNON. C.. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 111, p. 918 – 931, 2001.
- CLULOW, J.R.; MANSFIELD, L. J.;MORRIS, L. H. A.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C.. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v. 108, p. 298 – 308, 2008.

COHEN, M.V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials?. **Animal Internal Medicine**, v. 111, p. 918 – 931, 1989.

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.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa I. Effects on the motility of intact spermatozoa and sperm axonemes. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 368 – 378, 1992.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive species on spermatozoa : a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v. 10, p. 15 – 21, 1995.

EDDY, E.M. The spermatozoa. In: KNOBIL, E. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, p. 27 – 68, 1988.

GEE, E.K.; BRUEMMER, J.E.; SICILIANO, P.D.; McCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. Effects of dietary vitamin E supplementation on spermatozoa quality in stallion with suboptimal post-thaw motility. **Animal Reproduction Science**. v. 107, n. 3 – 4, p. 324 – 325, 2008.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O.; ALVARENGA. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**. v. 58, p. 277 – 279, 2002.

GRAHAN, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Proceedings...**(Abstract), 14th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, p. 307. 2000.

GRIVEAU, J.F.; DUMONT, E.; RENARD, P. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 103, p.17 – 26, 1995.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel dos oxidantes e anti-oxidantes na Andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p.187 – 195, 2004.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2089-2100, 2006.

- HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7^a Ed. São Paulo: Editora Manole. 2004. 516 p.
- HAMMERSTED, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOALAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73 – 88, 1990.
- HANADA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 60, p. 247 – 252, 1980.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v 62, p. 3 – 22, 2000.
- IMAI, H; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. Free **Radical Biology e Medicine**, v. 34, n. 2, p. 145 – 169, 2003.
- JASKO, D.J.; MARTIN, J.M.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**. v. 35, p. 1059 – 1068, 1991.
- JELEZARSKY, L.; VAISBERG, C.; CHAUSHEV, T.; SAPUNDJIEV, E. Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. **Theriogenology**, v. 69, p. 139 – 145, 2008.
- JULIANI, G.C.; PEREZ-OSÓRIO, J.; HENRY, M. Efeito de diferentes crioprotetores e curvas de congelamento sobre os espermatozoides eqüinos criopreservados. **Anais... Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 2009.
- KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3 – 4, p. 249 – 259, 2008.
- KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; WITHERSPON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility evaluation of stallion**. Society of Theriogenology. 1983.
- KIRK, E.S.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 317 – 318, 2001.
- LEWIS, S.E.M.; STERLING, E.S.L.; YOUNG, I.S. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 67, p. 142 – 147, 1997.

- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; CRESPO, F.; ARROYO, F.; FERNÁNDEZ, J.L.; ARANA, P.; JOHNSTON, S. D.; GOSÁLVEZ, J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. **Theriogenology**, v. 68, p. 1240 – 1250, .2007.
- MACLEOD, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. **Am. Journal of Physiology**, v.138, p.512-518, 1943.
- MAGESTRINI, M.; McDONNELL, S.; SEGUIN, F.; BEAU, P.; PALMER, E. Analysis of sex glands markers in equine seminal plasma of in the copula and copula induced ejaculates: Quantification by magnetic resonance spectroscopy. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON ERECTION AND EJACULATION IN HORSES AND MEN. 2. Nouzilly. 1996. **Proceedings...**, Nouzilly, p.45 – 53. 1996.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male Reproduction and semen**. New York: Springer Verlag, p. 23 – 28, 1981.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 47 – 51, 1979.
- MATOS, D.I.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, L.G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.
- MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G. M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, p. 273 – 276, 2002.
- MELO, C.Z.; MARTIN, F.; ORLANDI, C.; DELL'AQUA Jr., J.; 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, p. 171 – 175, 2007.
- MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSTIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCO, C.M. Effect of N-Acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.19, p 37 – 47. 2008.
- MICKINNON, A.O. Exames para avaliação da fertilidade do garanhão. **Anais da XI Conferência Anual da ABRAVEQ**, v. 29, p. 112 – 129, 2010.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial**. 5ª Ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. 344 p.

MORTIMER, S.T. CASA – Practical Aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAN, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, p. 2372 – 2381, .2005.

MORRIS, L. Advanced Insemination Techniques in mares. **Veterinary Clinics of North America**, n.22, p. 693 – 703, 2006.

PAGL, R.; AURICH, C.; KANKOFER, M. Anti-oxidative status and semen quality during cooled storage in stallions. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p.486-489 2006.

PALMER, E.. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 10, Urbana-Champaign , 1984.. **Proceedings...** v.1, p. 333 – 377. 1984.

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL`AQUA, J.A. Jr.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 184 – 187. 2002.

PASQUALOTTO, F.F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R. Relationship between oxidative stress, semen characteristics and clinical diagnosis men undergoing infertility investigations. **Fertility and Sterility**, v. 73, p. 459 – 464, 2000.

PONS-REJRAJI, H.; SION, B.; SAEZ, F.; BRUGNON, F.; JANNY, L.; GRIZARD, G. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. **Gynecology, Obstetrics and Fertility**. v. 28, p. 203 – 213, 2009.

PRESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and criopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597 – 612, 2006.

REGHINI, M.F.S.; ULIANI, R.C.; MONTEIRO, G.A., DELL`AQUA, J.Jr.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Utilização da N-Acetilcisteína na conservação do sêmen eqüino à 5⁰ e 15⁰ C. **Anais... XI Conferência Anual da Associação Brasileira do Veterinários de Equídeos**, v. 29, p. 326 – 327, 2010.

RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S.; ETKOVITZ, N.; BREITBARTH, H. Role the Hydrogen Peroxide in sperm capacitation and acrossome reaction. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 518 – 522, 2004.

- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 297-308, 1997.
- SAFARINEJAD, M.R.; SAFARINEJAD, S. Efficacy of selenium and/or N-Acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. **Journal of Urology**, v. 181, p. 741 – 751, 2009.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 737 – 752, 2002.
- SAMPER, J.C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Philadelphia: W.B. Saunders. 536p. 2000.
- SAMPER, J.C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Saunders Elsevier. St. Louis. 310 p.2009.
- SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B.; ULUTAS, P.A.; BILGEN, A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, p. 134 – 138, 2009.
- SCHAMBONY, A.; GENTZEL, M.; WOLFERS, H.; RAIDA, M.; NEUMANN, U.; TÖPFER-PETERSEN, E. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. **Biochim Biophys Acta** , v. 1387, p. 206 – 216, 1998.
- SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male fertility. **Urology**, v. 48, p.838 – 850, 1996.
- SCHOBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE., L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p.745 – 754, 2007.
- SIEME, H.; HARRISON, R.A.P.; PETRUNKINA, A.M.. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 276 – 292, 2008.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958 – 978, 2006.
- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E.. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. **Bulletin**, Fort Collins, n. 09, 92 pages. Fort Collins. 1999.

- SQUIRES, E.L., LINDSEY, A.C., BUCHANAN, B.R. A method to obtain pregnancies in mares using minimal sperm numbers. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 46, 2000, San Antonio, **Proceedings**... p. 335. 2000.
- SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1056 – 1065, 2004.
- TERRACIANO, P.B.; BUSTAMENTE-FILHO, I.C.; MIQUELITO, L.V.; ARLAS, T.R.; CASTRO, F.; MATTOS, R.C.; PASSOS, E.P.; OBERST, E. R.; LIMA, E.O.C. Criopreservação de espermatozoides eqüinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. **Ciência Rural**, v. 38, n. 7, p. 1972 – 1977. 2008.
- THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; TECHAKUMPHU, M.; AXNER, E. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. **Theriogenology**. v. 70, p. 233 – 240, 2008.
- VARNER, D. From a Sperm's Eye View – Revisiting Our Perception of This Intriguing cell. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRATICIONERS, 53, Orlando, 2007. **Proceedings**...Orlando, p.104 – 177. 2007.
- UDBY, L.; BJARTELL, A.; MALM, J.; EGESTEN, A.; LUNDWALL, A.; COWLAND, J.B. Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. **Journal of Urology**, v. 26, p. 333 – 342, 2005
- VIDAMENT, M.; YVON, J.M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANG, J.; NOUE, P.; COTTON, S.; LE TELLIER, A.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. **Animal Reproduction Science**. v. 68, p. 201 – 218, 2001.
- WANG, X.; SHARMA, R. K.; SIKKA, S.C. Oxidative stress is associated with increase apoptosis leading of spermatozoa DNA damage in patients with malefactor infertility. **Fertility and Sterility**, v. 80, p. 531 – 534, 2003.
- WENDEL, A. Glutathione Peroxidase. **Molecular and Cellular Enzymol**, v. 77, p. 325 – 332, 1981.
- WILMUT, I.; POLGE, C. The low temperatures preservation of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents. **Cryobiology**, v. 14, p. 471 – 478, 1977.

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

4 EXPERIMENTO

EFEITO DA ADIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES GLUTATIONA PEROXIDASE E CISTEÍNA AO DILUIDOR DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN EQUINO

Effect of addition of antioxidants glutathione peroxidase and cysteine in equine frozen semen medium

Barros, L.O.¹; Silva, S.V.¹; Almeida, F.C.¹; Silva, E.C.B.^{1,2}; Soares, P.C.³; Guerra, M.M.P.¹

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

²Curso de Doutorado da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO;

³ Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE.

*E-mail para correspondência: mpguerra@dmv.ufrpe.br

RESUMO

Objetivando-se analisar o efeito da adição de diferentes concentrações de glutathione peroxidase (GPx) e cisteína ao diluidor de congelação do sêmen de equinos, foram utilizados cinco garanhões da raça Quarto-de-Milha, com fertilidade comprovada. Amostras de sêmen foram colhidas com vagina artificial e diluídas em Botu Crio, acrescido de antioxidantes: G1= Controle (Sem antioxidantes); G2= 0,5 mM de N-Acetil-Cisteína; G3= 1 mM de N-Acetil-Cisteína; G4 = 1 U de Glutathione Peroxidase (GPx) e G5= 5 U de Glutathione Peroxidase (GPx). A seguir, as amostras de sêmen foram envasadas em palheta (0,5 mL; na concentração de 150×10^6 espermatozoides/palheta), congeladas utilizando o método automatizado e armazenadas em botijão criogênico à -196°C . As amostras foram descongeladas (37°C por 30 segundos) e submetidas às análises espermáticas (cinética, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e potencial de membrana mitocondrial), imediatamente após a descongelação (T0) e após 60 minutos (T60). Amostras de sêmen suplementadas com GPx 5 U e cisteína 0,5 mM não apresentaram diferenças ($P>0,05$) na porcentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial, assim como com acrossomas e membrana plasmática íntegras, entre os tempos T0 e T60. Amostras congeladas com cisteína 1 mM apresentaram maior ($P<0,05$) percentual de gametas com acrossomas íntegros do que os de GPx 1 e 5 U e cisteína 0,5 mM. Espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial foram encontrados no T60 em maior ($P<0,05$) percentual no garanhão 5 em relação aos garanhões 1 e 2. A cinética espermática evidenciou maiores ($P<0,05$) valores de VCL e VAP nas amostras controle, no T0 do que no T60. De maneira geral, o cavalo 4 apresentou maiores ($P<0,05$) valores cinéticos que os demais animais. Conclui-se que a adição de cisteína 1mM preservou melhor a integridade de acrossoma espermático, e que a resposta individual de cada garanhão influencia significativamente os resultados dos parâmetros analisados.

Palavras-chave: antioxidantes, espermatozóide equino, criopreservação.

Abstract

The objective of this study was to analyze the effect of the addition of different concentrations of the antioxidants glutathione peroxidase (GPx) and cysteine in equine

frozen semen medium. Five Quarter Horse stallions, with proven fertility were used. Semen samples were collected with artificial vagina and diluted in Botu Crio added with antioxidants: G1= Control (without antioxidants); G2= 0.5 mM of N-Acetyl-Cysteine; G3= 1 mM of N-Acetyl-Cysteine; G4 = 1 U of Glutathione Peroxidase (GPx) and G5= U of Glutathione Peroxidase (GPx). Semen samples were packed straws (0.5 mL; 150×10^6 concentration of spermatozoa/straw), frozen in automated method and stored in liquid Nitrogen ($-196\text{ }^\circ\text{C}$). Semen samples were thawed ($37\text{ }^\circ\text{C}$ per 30 seconds) and submitted to sperm analyses (kinematic, plasma membrane and acrosome integrity, and potential of mitochondrial membrane), immediately after thawing (T0) and after 60 minutes (T60). Semen samples supplemented with GPx 5 U and cysteine 0.5 mM did not show difference ($P>0.05$) on the percentage of sperms with high percentage of potential of mitochondrial membrane, as well as with intact acrosome and plasma membrane between T0 and T60 times. Frozen samples with cisteine 1 mM showed high ($P<0.05$) of gametes with intact acrosome than those of GPx 1 and 5 U and cisteine 0.5mM. Spermatozoa with higher percentage of potential of mitochondrial membrane was founded in T60 ($P<0.05$) in stallion 5 than stallions 1 and 2. The sperm kinematic evidenced a high values of VCL and VAP ($P<0.05$) in control samples, in T0 than T60. In general, the stallion 4 presented high values ($P<0.05$) of kinematic parameters than other stallions. It can be concluded that addition of cysteine (1mM) in equine frozen semen medium preserved better the acrosome integrity and that the individual response of each stallion influence significantly the results of the sperm analysis.

Keywords: antioxidants, equine spermatozoa, cryopreservation.

1 Introdução

O uso de sêmen congelado na espécie eqüina apresenta-se como uma importante biotécnica aplicada ao manejo reprodutivo desta espécie (BALL et al., 2001). Entretanto, a restrição ao uso deste tipo de sêmen por algumas associações de criadores de eqüinos no mundo, além da baixa longevidade espermática pós-descongelamento e consequente redução dos índices reprodutivos, tornaram o uso do sêmen congelado limitado e oneroso ao longo dos anos (SQUIRES et al., 2000; LOOMIS & GRAHAM, 2008).

Durante o processo de congelamento, quando exposto a baixas temperaturas, o espermatozóide eqüino produz maior quantidade de espécies reativas ao oxigênio (ROS), se comparado com a produção de ROS durante o processo de refrigeração (GUERRA et al., 2004), causando estresse oxidativo (BALL, 2008) e, consequentemente, danos à membrana celular, reduzindo a motilidade e a longevidade espermática, além de causar danos diretos ao DNA espermático, o que ocasiona comprometimento da transmissão do material genético do garanhão (REGHINI et al., 2010). A estrutura do espermatozóide equino é potencialmente susceptível à ação de ROS, em virtude da quantidade elevada de lipídeos poliinsaturados, como o colesterol,

presentes nas membranas plasmáticas, que atuam estabilizando e diminuindo a temperatura que a membrana altera seu estado de fluído para gel (KIRK et al., 2001).

Os antioxidantes são inibidores das ROS na sua formação ou no mecanismo de ação, presentes no espermatozóide e no plasma seminal, atuando de forma independente ou sinérgica (AURICH et al., 2008). A principal defesa antioxidante é realizada pela ação da Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD), Glutathiona Reduzida (GR) e Glutathiona Peroxidase (GPx), presentes no espermatozóide e no plasma seminal (VARNER, 2007; ANDRADE et al., 2010). A redução da concentração de GPx está relacionada à infertilidade de homens (MAIA et al., 2009) e nos bovinos a atividade da vesícula seminal tem influência sobre a atividade da GPx, determinando baixa da capacidade fertilizante do sêmen (BAUMBER et al., 2005), enquanto nos eqüinos verificou-se correlação positiva entre motilidade e integridade de membrana e a presença de GPx e catalase, indicando que estes antioxidantes contribuem para o aumento inicial da motilidade e da integridade da membrana espermática (PAGL et al., 2006).

Dentre os complexos antioxidantes não-enzimáticos pode-se citar a cisteína, proteína que nos eqüinos está presente nas secreções da ampola do ducto deferente e da vesícula seminal, envolvida nos processos de espermatogênese, na maturação espermática e, possivelmente, na penetração do espermatozóide na zona pelúcida (VARNER, 2007). Estudos com sêmen de bovinos (SARIOZKAN et al., 2009) e humano (SAFARINEJAD e SAFARINEJAD, 2009) demonstraram que a cisteína oferece proteção efetiva na integridade funcional do acrossoma e da mitocôndria, melhorando a motilidade (SARIOZKAN et al., 2009) e a integridade da membrana espermática, pós-descongelção (PAGL et al., 2006), sem reduzir a concentração de ROS (MICHAEL et al., 2008).

Em diversas espécies, a adição de antioxidantes na dieta e nos meios de refrigeração e congelação de sêmen mostrou-se eficaz na manutenção da fertilidade espermática, mesmo na presença de ROS, com redução dos danos causados às membranas celulares (ALMEIDA & BALL, 2005; KANKOFER et al., 2005; BUTAMANTE-FILHO et al., 2006; DEICHSEL et al., 2008; MICHAEL et al., 2008; SAFARINEJAD & SAFARINEJAD, 2009), porém sem efeitos na melhoria da motilidade espermática (BAUMBER et al., 2005; VARNER, 2007; GEE et al., 2008; MAIA & BICUDO, 2010).

Assim, objetivou-se com esse trabalho analisar o efeito da adição de diferentes concentrações dos antioxidantes GPx e cisteína ao diluidor de congelação do sêmen equino sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozóides.

2 Materiais e Métodos

2.1 Material

Os antioxidantes (GPx e cisteína) e demais produtos químicos utilizados nesse experimento foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co[®] (St Louis, Missouri, USA).

2.2 Animais

Foram utilizados cinco garanhões da raça Quarto-de-Milha, com idade variando entre cinco e 21 anos, com fertilidade comprovada. Os animais foram criados no regime de alimentação com feno de capim Tifton (*Cynodon dactylon*), ração concentrada (Omolene Tradicional, Purina Agribands) com 22% de proteína bruta (PB), suplemento mineral (Coequi, Tortuga) e água *ad libitum*.

2.3 Local do Experimento

As colheitas e a congelação do sêmen foram realizadas no mês de julho (Estação de Monta), no Município de Ingá – PB (Latitude -07°16'51" e Longitude- 35°36'16"), cujo índice pluviométrico é de 850 – 1200 mm anuais. As análises de integridade de membrana e acrossoma, assim como a avaliação do potencial mitocondrial foram realizadas no Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), distante 200 km do haras onde as amostras foram colhidas e congeladas. A cinética espermática (CASA) foi realizada no Laboratório de Tecnologia de sêmen caprino e ovino, do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB), da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

2.4 Colheitas de Sêmen

Foram realizadas cinco colheitas de sêmen por animal, com intervalo de 48 horas, utilizando vagina artificial, modelo Botucatu (Biotech, Botucatu, São Paulo,

Brazil), com temperatura entre 40 a 42 °C. As colheitas foram realizadas com auxílio de uma fêmea em cio como manequim, totalizando 25 colheitas. As colheitas foram realizadas em ordem aleatória, afim de não interferir com a avaliação estatística dos dados.

2.5 Análises do sêmen

Após a colheita, as amostras de sêmen foram mantidas a 37 °C em banho-maria, durante a análise dos parâmetros macroscópicos (volume, aspecto e cor) e microscópicos (motilidade, vigor, concentração). Para análise da motilidade (0-100%) e vigor (0-5), uma alíquota (20 µL) de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37 °C em mesa térmica (Neovet, Uberaba, MG, Brasil), e observada em microscópio de Contraste de Fase (Olympus, Tóquio, Japão), com aumento de 40x. Para análise da concentração espermática, uma amostra (10 µL) de sêmen foi diluída em 2 mL de solução de Formol-Salina e a contagem realizada em Câmara de Neubauer, com o resultado expresso em milhões de espermatozoides por mL.

2.6 Congelação do Sêmen

Imediatamente após a análise, as amostras de sêmen foram processadas, diluídas na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor) com meio Botu Sêmen (Biotech, Botucatu, SP, Brasil), centrifugadas (600 x g) durante 10 minutos (MARTIN et al., 1979). Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e procedeu-se a ressuspensão do “pellet” utilizando meio de diluição Botu Crio (Biotech, Botucatu, SP, Brasil), acrescido dos antioxidantes GPx e cisteína, de acordo com os grupos experimentais: G1= Controle (sem antioxidantes); G2=5 U de GPx; G3=1 U de GPx (BLOTTNER et al., 2001); G4=0,5 mM de N-Acetyl-Cisteína e G5=1 mM de N-Acetyl-Cisteína (MICHAEL et al., 2008; SARIOZKAN et al., 2009). A seguir, o sêmen foi envasado em palheta (0,5 mL) na concentração de 150×10^6 espermatozóides/palheta (CLULOW et al., 2008). Para congelação, utilizou-se o sistema automatizado (TK 3000, TK Tecnologia em congelação, Uberaba, Brasil). A curva de congelação utilizada determina queda de temperatura de 0,5°C por minuto até atingir 5°C, em seguida queda de 1°C por minuto até -120°C.

2.7 Descongelamento das amostras de sêmen

As amostras foram descongeladas utilizando-se Banho-Maria à 37°C por 30 segundos. Após a descongelação, o sêmen foi transferido para tubos de vidro, individuais e identificados, e mantidos à 36°C em Banho-Maria, durante as análises.

Para avaliação no CASA, as amostras foram descongeladas utilizando o mesmo protocolo, transferidas para os eppendorfs e diluídas na proporção sêmen:solução de Ringer com Lactato, afim de se facilitar a visualização e captação dos campos na Câmara de Makler[®] (Sefi Medical Instrument, Haifa, Israel), segundo Mortimer (2000), mantidos em Banho-Maria à 36°C, durante os tempos (T0 e T60) das análises.

2.8 Análise por Microscopia de Epifluorescência

Para avaliação de integridade de membrana plasmática, utilizou-se o método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e Iodeto de Propídeo (IP), segundo Harrison e Vickers (1990) e modificado por Coletto et al. (2002). Aliquotas (50 µL) de sêmen foram diluídas em 150 µL de Tris (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488 g de frutose, 100 mL de água bidestilada; pH 6,8), contendo 5 µL de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 µL de IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos a 37 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Os espermatozoides (n= 200) foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com aumento de 400x, usando filtro de emissão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485-520 nm, e classificados com membrana intacta, quando se apresentavam corado em verde, e com membranas danificadas, quando corados em vermelho.

A integridade de acrossoma foi avaliada utilizando-se o conjugado isotiocionato de fluoresceína-*Psium sativum* (FITC-PSA) (CELEGNI et al., 2010). Para avaliação, esfregaços de cada amostra, armazenados a 4°C, foram corados com alíquotas de 50 µL da solução de trabalho de PSA, incubados por 30 minutos, protegidos da luz, e lavados em PBS. Duzentos espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência, com aumento de 1000x, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação, e foram classificados como lesados quando corados em verde, e intactos, quando não apresentavam coloração.

O potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides foi determinada pela utilização do fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE e WELCH, 2006). Aliquotas (50 μ L) de sêmen foram diluídas em 150 μ L de Tris contendo 5 μ L de JC-1 (0,15 mM em DMSO), incubadas por 10 minutos a 38 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de Glutaraldeído. Duzentos espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência, com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. As células que apresentavam a peça intermediária corada em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana mitocondrial.

2.9 Cinética espermática

As amostras de sêmen (1 mL) foram inicialmente diluídas em solução fisiológica (0,9% NaCl), com o objetivo de reduzir a concentração espermática (50 milhões de espermatozoides/mL) e facilitar a captação das imagens, evitando sobreposição das células espermáticas, segundo Mortimer (2000). A análise foi realizada utilizando-se a Câmara de Makler[®] (Sefi Medical Instrument, Haifa, Israel), com capacidade para 10 μ L, previamente aquecida a 37 °C. A câmara foi colocada no microscópio de contraste de fase (Nikon[™] H5505, Eclipse 50i, Japão) e as imagens capturadas por uma vídeo-câmera (Basler Vision Technologie[™] A312FC, Ahrensburg, Alemanha).

Pelo sistema CASA (Sperm Class Analyzer – SCA[™], Microoptics, S.L., Version 3.2.0, Barcelona, Espanha) foram avaliados os seguintes parâmetros: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), expressos em porcentagem; velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média do percurso (VAP), expressos em micrômetros por segundos; amplitude do descolamento lateral da cabeça espermática (ALH), expresso em micrômetros e frequência do batimento flagelar cruzado (BCF), expressa em Hertz.

2.10 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para determinar a normalidade dos dados. Tendo em vista a distribuição não-gaussiana, procedeu-se com

transformação logarítmica. Por conseguinte, os dados foram submetidos ao modelo Split-Plot de Análise de Variância (ANOVA), com contraste de médias pelo teste de Tukey. O procedimento PROC MIXED do SAS (2005) para medidas repetidas foi utilizado. Análise de correlação de Pearson foi realizada para verificar o grau de relação entre pares de variáveis (LITTLE e HILLS, 1978), ficando estabelecido a existência de correlação de alta intensidade entre as variáveis quando $r > 0,60$; média intensidade quando $0,30 < r < 0,60$; e de baixa intensidade quando $r < 0,30$. Todos os valores foram expressos em médias e desvio-padrão, sendo o valor de $P < 0,05$ considerado como significativo.

Para cada garanhão, foi obtido uma média de cinco repetições/animal objetivando-se diminuir a variabilidade dos fatores, tratamento e tempo.

3 Resultados

Os resultados das análises espermáticas pós-descongelamento, utilizando as sondas fluorescentes (Tabela 1) mostrou que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) nos percentuais de gametas com integridade de acrossoma (IAC) e de membrana plasmática íntegra (IMP), assim como com alto potencial de membrana mitocondrial (aPMM) das amostras do grupo controle e demais grupos, em cada tempo de avaliação (0 e 60 minutos), assim como entre 0 (T0) e 60 minutos (T60). Entretanto, observou-se maior ($P < 0,05$) porcentagem de espermatozoides com acrossomas íntegros (IAC) nas amostras congeladas dos grupos controle e suplementados com GPx (1U e 5U), imediatamente após a descongelamento (T0) (Tabela 1).

Além disso, observou-se que 60 minutos após a descongelamento (T60), o grupo suplementado com cisteína (1mM) apresentou maior ($P < 0,05$) porcentagem de gametas com acrossomas íntegros do que os demais grupos, onde ocorreu redução da porcentagem de acrossomas íntegros (Tabela 1). A análise individual dos reprodutores mostrou que o garanhão 4 apresentou menor ($P < 0,05$) porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra em relação aos demais cavalos, tanto imediatamente após a descongelamento (T0) quanto 60 minutos após (T60) (Tabela 2).

Após a descongelamento do sêmen, grande parte dos parâmetros cinéticos (Tabela 3) (MP, VR, VM, VSL, LIN, STR, WOB, ALH e BCF) não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre o grupo controle e os grupos experimentais nos tempos avaliados (T0 e T60). Contudo, os parâmetros VCL e VAP apresentaram redução

($P < 0,05$) nas amostras do grupo controle entre o T0 e o T60. Esse fato não foi observado nos grupos suplementados com antioxidantes (Tabela 3). Todavia, a análise da cinética espermática de cada animal (Tabela 4) evidenciou diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação aos tempos e grupos experimentais. O animal 4 apresentou maiores ($P < 0,05$) valores de MT, MP, VR, VSL, VAP e ALH (Tabela 4), do que os outros animais.

Avaliando os parâmetros do CASA, verificou-se que estes apresentaram um alto grau de relação positiva ($r > 0,60$; $P < 0,0001$) com um grande número de pares de variáveis entre si, como: PMot x MT, VR, VM, VCL, VSL e VAP; VR x VCL, VSL, VAP; VM x VCL; VCL x CSL e VAP; CSL x VAP, LIN e WOB; LIN x STR e WOB; STR x WOB. A motilidade total apresentou moderada relação positiva ($0,30 > r < 0,60$; $P < 0,05$) com VR, VM, VCL, VSL, VAP, LIN, STR e WOB, bem como PM x ALH; VR x VM e STR; VM x VCL, VSL e VAP; VCL x LIN e WOB; VSL x STR; VAP x LIN, STR e WOB; BCF x STR e ALH (Tabela 5).

Também foi observada relação significativa de alguns parâmetros do CASA ($0,30 > r < 0,60$; $P < 0,05$) com o IMP e IAc, entre eles, destacam-se: IMP x VR, VCL, VSL, VAP e MT; IAc com VR, VCL e VSL (Tabela 5).

4 Discussão

Os danos causados pelas ROS aos espermatozoides foram demonstrados inicialmente, quando se expôs os gametas humanos a elevadas concentrações de oxigênio, resultando em rápida perda da motilidade espermática. Contudo, esta perda foi reduzida com a adição de Catalase ao meio diluidor (MAcLEOD, 1943). A adição de antioxidantes na dieta e em meios diluidores de sêmen eqüino, para refrigeração e congelamento, já foi estudada por diversos autores, porém com resultados controversos (BAUMBER, et al., 2005; VARNER, 2007; PONS-REJRAIJ et al., 2009).

O fato da adição de GPx e cisteína ao diluente de congelamento de sêmen de garanhões não ter evidenciado diferenças significativas no porcentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (IMP) e alto potencial de membrana mitocondrial (aPMM), assim como entre os animais utilizados, pode estar relacionado às concentrações dos antioxidantes, presença de agentes antioxidantes no meio de

congelamento utilizado ou, ainda, devido a diferentes ROS e seus respectivos mecanismos de ação no sêmen pós-descongelamento (WATSON, 2000).

O efeito positivo da adição de 1 mM de cisteína na análise de integridade de acrossoma (IAC), no tempo T60 pós-descongelamento, em relação ao grupo controle e demais grupos experimentais, pode estar relacionado à inibição da fosforilação da tirosina que atua na capacitação espermática, através do bloqueio dos canais de íons na membrana plasmática (VARNER, 2007), oferecendo proteção efetiva da integridade funcional do acrossoma e da mitocôndria, melhorando a motilidade (SARIOZKAN et al., 2009) e a integridade da membrana espermática pós-descongelamento (PAGL et al., 2006), sem eliminar a presença de ROS (MICHAEL et al., 2008).

A adição dos antioxidantes (GPx e cisteína) não determinou efeito positivo no percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e com alto potencial de membrana mitocondrial após o processo de congelamento do sêmen de equino. Este resultado ratifica os relatos de Reghini et al. (2010), que, ao adicionarem cisteína ao diluente de refrigeração de sêmen equino, em concentrações diferentes das utilizadas no presente estudo (1mM, 5mM, 10mM, 15mM e 20mM), não observaram melhoria dos percentuais de gametas membrana plasmática íntegra, assim como dos parâmetros cinéticos (MT e PM), após 24 horas de refrigeração com temperaturas que variaram de 5 – 15 °C. No entanto, ressalta-se que o processo de refrigeração determinar menor produção de ROS do que a congelamento de sêmen (GUERRA et al., 2004), objetivo do presente estudo.

O menor percentual de espermatozoides obtidos do animal 4 que apresentaram acrossoma íntegro no tempo T60, provavelmente foi causada por hiperativação celular, ocasionada pelo rápido retorno do metabolismo do oxigênio, provocando aumento na produção de ROS (BALL, 2008). Além disso, este resultado pode ser explicado pelas diferenças entre indivíduos, ejaculados, metabolismo e bioquímica espermática, que altera os parâmetros seminais (LOOMIS et al., 2008), sendo a proporção de espermatozoides com membranas danificadas, um indicativo de fertilidade reduzida em garanhões (BLOTTNER et al., 2001).

A ausência de diferença entre os grupos experimentais, com relação aos parâmetros avaliados através do sistema CASA (MT, MP, VR, VM, VSL, LIN, STR, WOB, ALH e BCF) nos tempos (T0 e T60) analisados, são contrários aos resultados de Schober et al. (2007), ao demonstrarem que a criopreservação determina redução da motilidade espermática pós-descongelamento, devido a danos causados à mitocôndria,

reduzindo, assim, a síntese de energia (ATP), necessária para a movimentação dos espermatozoides no trato genital da fêmea. Estes danos nas mitocôndrias determinam mudanças na trajetória linear e redução da velocidade, sem aumentar a proporção de espermatozoides estáticos (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009), o que explicaria a redução da VCL e VAP dos espermatozoides do grupo controle, nos tempos analisados.

Os parâmetros de MT, PM, VR, VSL, VP e ALH, maiores no animal 4, em comparação aos demais animais utilizados no experimento, pode estar relacionado à expressão dos marcadores apoptóticos nos ganhões e ejaculados, que diferem na sua congelabilidade, uma vez que maior concentração destes marcadores pode determinar pior resultado pós-descongelação (BALL, 2008; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009).

Além disso, sugere-se que a realização de outros experimentos com diferentes concentrações de GPx, cisteína, e outros antioxidantes, bem como a avaliação *in vivo* da viabilidade do sêmen equino pós-descongelação, possam melhorar a fertilidade do sêmen equino congelado.

5 Conclusão

A adição de cisteína 1mM ao diluente de congelação de sêmen equino preserva melhor a integridade de gametas com acrossomas íntegros, e que a resposta individual de cada ganhão influencia significativamente os resultados dos parâmetros analisados.

6 Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de mestrado e de recursos financeiros, imprescindíveis para realização deste experimento; À CAPES e CNPq, pela concessão de recursos financeiros.

7 Referências bibliográficas

AGARWAL, A.; SAID, T.M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: A clinical approach. **Biology Journal**, v. 95, p. 503 – 507, 2005.

ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e

principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79 – 85, 2010.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3 – 4, p. 268 – 275, 2008.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 260 – 267, 2008.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability, and acrosomal integrity of equine spermatozoa during store at 5 degrees C. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 577-589, 2001.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **Animal Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 772 – 779, 2005.

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p.75 - 88, 2001.

BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; PEDERZOLLI, C.D.; SGARAVATTI, A.M.; MATTOS, R.C.; DUTRA-FILHO, C.S.; JOBIM, M.I.M. Activity of glutathione peroxidase and catalase in stallion semen during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p.70-73, 2006.

CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 536-543, 2010.

CLULOW, J.R.; MANSFIELD, L. J.;MORRIS, L. H. A.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C.. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v. 108, p. 298 – 308, 2008.

DEICHSEL, K.; PALM, F.; KOBLISCHKE, P.; BUDIK, S.; AURICH, C. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. **Theriogenology**, v. 69, p. 940-945, 2008.

GEE, E.K.; BRUEMMER, J.E.; SICILIANO, P.D.; McCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. Effects of dietary vitamin E supplementation on spermatozoa quality in stallion with

suboptimal post-thaw motility. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3 – 4, p. 324 – 325, 2008.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel dos oxidantes e anti-oxidantes na Andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p.187 – 195, 2004.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, C.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5⁰ C. **Theriogenology**, v. 63, p. 1354-1365, 2005.

KIRK, E.S.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 317 – 318, 2001.

LITTLE, T. M.; HILLS, F. J. **Agricultural experimentation: design and analysis**. New York: John Wiley, p. 350, 1978.

LOOMIS, P.R.; GRAHAM, J.K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 119-128, 2008.

MAcLEOD, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. **American Journal of Physiology**, v. 138, p. 512-518, 1943.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 183-193, 2009.

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LÍTINA, D.J.; SARASIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCOS, C.M. Effect of N-Acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 120, p.1-7, 2008.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GARCÍA, B.M.; GALLARDO-BOLAÑOS, J.M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p.393-403, 2009.

PAGL, R.; AURICH, C.; KANKOFER, M. Anti-oxidative status and semen quality during cooled storage in stallions. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p.486-489 2006.

- PONS-REJRAJI, H.; SION, B.; SAEZ, F.; BRUGNON, F.; JANNY, L.; GRIZARD, G. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. **Gynecology, Obstetrics and Fertility**. v. 28, p. 203 – 213, 2009.
- REGHINI, M.F.S.; ULIANI, R.C.; MONTEIRO, G.A., DELL'AQUA, J.Jr.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Utilização da N-Acetilcisteína na conservação do sêmen equino à 5^o e 15^o C. In: XI Conferência Anual da Associação Brasileira dos Veterinários de Equídeos – ABRAVEQ. **Anais...** v. 29, p. 326 – 327, 2010.
- SAFARINEJAD, M.R.; SAFARINEJAD, S. Efficacy of Selenium and/or N-Acetyl-Cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. **The Journal of Urology**, v.181, p.741-751, 2009.
- SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B.; ULUTAS, P.A.; A.BILGEN. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, p. 134-138, 2009.
- SAS. **SAS user's guide, statistics version**. Cary, NC: Statistical Analysis System Institute Inc., 2005.
- SCHOBBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE., L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p.745 – 754, 2007
- SQUIRES, E.L., LINDSEY, A.C., BUCHANAN, B.R. A method to obtain pregnancies in mares using minimal sperm numbers. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS,46, 2000,San Antonio, **Proceedings...** p. 335. 2000.
- VARNER, D. From a Sperm's Eye View – Revisiting Our Perception of This Intriguing cell. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRATICIONERS, 53, Orlando, 2007. **Proceedings...**Orlando, p.104 – 177. 2007.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

Tabela 1 – Valores de média e desvio-padrão de integridade de membrana plasmática (IMP), alto potencial de membrana mitocondrial (aPMM) e integridade de acrossoma (IAc) das amostras de sêmen equino congeladas em Botu Sêmen suplementado com GPx e Cisteína, imediatamente após a congelamento (T0) e após 60 minutos (T60)

Tratamentos	Tempos	IMP(%)	aPMM(%)	IAc(%)
Controle	0	60,01±12,89	62,27±7,92	85,51±1,92
	60	54,93±9,87	48,47±9,83	82,41±4,46 ^{AB}
1 U GPx	0	56,91±8,04	57,37±6,82	87,28±5,51
	60	53,10±4,38	53,28±13,08	76,23±3,70 ^C
5 U GPx	0	59,05±8,56	59,47±6,71	84,53±3,45 ^a
	60	50,33±7,42	51,58±14,32	79,86±2,95 ^{bBC}
0,5 mM Cisteína	0	49,93±8,58	56,72±5,06	82,10±2,92 ^a
	60	56,45±8,50	55,02±13,63	77,05±4,62 ^{bBC}
1 mM Cisteína	0	47,50±13,86	54,04±4,27	82,56±6,69
	60	55,32±11,26	57,04±7,66	86,98±4,31 ^A
Tempos		0,7470	0,0742	0,0060
T 0 nos tratamentos		0,2738	0,3425	0,3610
T 60 nos tratamentos		0,8167	0,8240	0,0029

*Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças em nível de 5% de probabilidade entre tempos dentro de cada tratamento; **Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças em nível de 5% de probabilidade entre os tempos de 60 minutos após o descongelamento.

Tabela 2 – Valores de média e desvio-padrão de integridade de membrana plasmática (IMP), alto potencial de membrana mitocondrial (aPMM) e integridade de acrossoma (IAc), por animal, das amostras de sêmen equino congeladas em Botu Crio suplementado com GPx e Cisteína, imediatamente após a congelação (T0) e após 60 minutos (T60)

Animais	Tempos	IMP(%)	IMM(%)	IAc(%)
1	0	53,20±9,87 ^a	57,77±7,11	82,63±4,05
	60	59,60±5,29 ^A	43,83±6,63 ^C	78,88±8,88
2	0	64,47±8,06 ^a	60,16±8,15	84,60±3,80
	60	54,45±3,75 ^A	46,05±7,78 ^{BC}	80,16±4,80
3	0	55,76±4,20 ^a	56,88±4,58	83,18±3,55
	60	58,65±6,20 ^A	58,35±8,25 ^{AB}	80,54±3,95
4	0	40,70±9,17 ^b	59,55±3,00	40,70±9,17
	60	41,53±5,25 ^B	53,20±14,70 ^{ABC}	84,15±5,34
5	0	59,26±8,33 ^a	55,50±8,97	84,55±7,38
	60	55,90±5,07	63,95±5,60 ^A	78,80±2,80
T 0 nos tratamentos		0,0026	0,8043	0,6207
T 60 nos tratamentos		0,0001	0,0130	0,5608

*Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças ao nível de 5% de probabilidade entre os tempos 0; **Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças ao nível de 5% de probabilidade entre os tempos de 60.

Tabela 3 – Valores de média e desvio-padrão da cinética de espermatozóides equinos submetidos a congelação após diluição em Botu Cio (controle), suplementados com GPx e cisteína, imediatamente após a descongelação T0 e após 60 minutos (T60)

Tratamentos	Tempos	MT	MP (%)	VR (µm/s)	VM (µm/s)	VCL (µm/s)	VSL (%)	VAP (%)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
Controle	0	52,32±6,8	13,44±5,6	8,13±4,5	10,33±3,9	44,37±5,5 ^a	29,54±5,4	35,52±5,6 ^a	65,75±5,6	82,36±2,4	79,50±4,8	2,69±0,4	8,45±0,4
	60	50,96±11,4	13,36±8,4	5,48±3,1	8,09±3,6	38,87±6,9 ^b	25,80±6,1	31,07±6,6 ^b	65,75±3,5	82,21±2,2	79,54±2,5	2,70±0,7	8,27±0,9
5U GPx	0	55,58±14,6	11,96±2,2	7,16±2,8	8,38±2,5	41,34±4,3	27,74±3,8	33,50±4,4	67,04±3,1	82,52±1,8	81,09±2,5	2,61±0,2	8,39±0,4
	60	61,16±12,6	13,40±6,0	5,80±3,9	11,80±5,1	40,00±6,1	27,70±5,0	33,00±5,3	67,90±3,6	82,50±2,5	81,90±2,3	2,50±0,3	8,00±0,5
1U GPx	0	54,76±13,8	10,60±6,5	6,70±4,3	7,50±3,6	41,10±6,2	27,50±5,9	33,30±5,9	66,80±6,6	82,00±4,5	80,90±4,4	2,60±0,2	8,30±0,7
	60	58,94±13,1	14,30±7,3	7,50±4,9	8,50±3,4	40,60±8,4	25,40±7,2	32,200±78	61,70±5,2	78,30±4,0	78,50±3,0	2,80±0,7	7,80±0,7
0,5 mM Cisteína	0	56,88±13,8	11,30±5,7	5,40±2,9	9,00±4,4	38,60±4,8	27,50±4,6	32,10±4,9	70,80±4,1	85,30±2,0	82,80±3,2	2,50±0,3	8,60±0,1
	60	59,70±8,1	12,37±8,1	5,38±3,9	14,00±8,9	36,90±7,8	25,32±7,4	29,68±7,4	68,24±4,8	84,70±3,1	80,40±2,9	2,47±0,4	8,65±0,7
1 mM Cisteína	0	48,28±14,3	12,97±14,1	5,08±3,9	8,57±5,5	38,21±5,8	24,15±4,4	29,67±4,8	63,25±4,7	80,93±2,8	77,77±3,7	2,49±0,2	8,28±0,5
	60	59,46±7,0	8,94±4,7	5,23±3,6	8,33±3,1	34,35±5,3	22,87±3,9	27,30±4,3	66,80±6,9	83,23±4,1	79,57±4,7	2,57±0,3	8,54±0,6
Tempos		0,0886	0,5009	0,1985	0,2311	0,0163	0,0539	0,0365	0,6272	0,6039	0,6464	0,8613	0,1815
T 0 nos tratamentos		0,8135	0,7139	0,6929	0,8617	0,3982	0,5417	0,4963	0,2398	0,2288	0,3246	0,6974	0,6781
T 60 nos tratamentos		0,5909	0,7829	0,8817	0,3271	0,6284	0,8000	0,6400	0,2622	0,0680	0,5665	0,8343	0,2656

MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; VR = velocidade rápida; VM = velocidade média; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade em linha reta; VAP = velocidade média do percurso; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; WOB = índice de oscilação ou wobble; ALH = amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozóide; BCF = batimento flagelar cruzado. *Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença (P<0,05).

Tabela 4 – Valores de média e desvio-padrão da cinética, por animal, de espermatozoides equinos submetidos a congelamento após diluição em Botu Crio (controle) suplementado com GPx e cisteína, imediatamente após a congelamento (T0) e após 60 minutos (T60)

Animais	MT	MP (%)	VR ($\mu\text{m/s}$)	VM ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL (%)	VAP (%)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
1	47,52±9,13 ^b	6,93±2,78 ^b	3,74±1,63 ^b	5,32±2,11 ^c	35,69±5,47 ^c	23,89±4,49 ^{bc}	28,66±5,04 ^c	66,67±5,09 ^{ab}	82,74±3,23 ^{ab}	80,14±3,56	2,29±0,25 ^c	7,66±0,53 ^c
2	52,90±6,77 ^b	11,08±2,73 ^b	5,28±1,68 ^b	10,35±3,03 ^{ab}	39,88±3,78 ^b	26,72±3,28 ^b	32,40±3,55 ^b	66,56±4,36 ^{ab}	81,67±3,14 ^b	80,97±2,90	2,40±0,07 ^{bc}	8,28±0,45 ^b
3	52,53±10,18 ^b	9,81±5,61 ^b	4,29±1,39 ^b	8,90±7,18 ^b	36,58±4,19 ^{bc}	24,20±4,88 ^{bc}	29,38±4,87 ^{bc}	65,33±5,69 ^b	81,50±2,91 ^b	79,79±4,32	2,67±0,54 ^{ac}	8,29±0,47 ^b
4	69,70±5,38 ^a	22,10±6,14 ^a	12,41±2,30 ^a	13,51±2,00 ^a	48,18±3,45 ^a	33,84±2,96 ^a	39,55±3,06 ^a	70,03±3,79 ^a	85,10±2,25 ^a	81,97±2,50	2,70±0,14 ^a	8,63±0,19 ^a
5	56,37±12,33 ^b	11,34±5,89 ^b	5,21±1,79 ^b	9,16±3,54 ^b	36,87±4,39 ^{bc}	23,14±2,18 ^c	28,72±3,18 ^c	63,49±4,99 ^b	81,00±3,85 ^b	78,12±3,35	2,89±0,35 ^a	8,76±0,57 ^a
“P”	0,0001	0,0001	0,0001	0,0013	0,0001	0,0001	0,0001	0,0472	0,0184	0,1364	0,0012	0,0001

MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; VR = velocidade rápida; VM = velocidade média; VCL = velocidade curvilínea; VSL = velocidade em linha reta; VAP = velocidade média do percurso; LIN = linearidade; STR = retilinearidade; WOB = índice de oscilação ou wobble; ALH = amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide; BCF = batimento flagelar cruzado. *Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença (P<0,05).

Tabela 5 – Coeficiente de Correlação de Pearson entre os parâmetros do sêmen equino submetido a congelção após diluição em Botu Crio(controle) suplementado com GPx e cisteína

	IMP ¹	IMM	IAC	PMot	VR	VM	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF	Mot. Total
IMP	1	0,18	-0,04	-0,42	-0,56**	-0,30	-0,52**	-0,51**	-0,51**	-0,23	-0,29	-0,16	-0,13	-0,16	-0,33*
IMM		1	0,21	0,20	0,09	0,05	0,09	0,11	0,11	0,11	0,06	0,13	0,26	0,20	0,18
IAC			1	0,15	0,28*	0,10	0,28*	0,28*	0,27	0,17	0,16	0,13	0,02	0,26	0,12
PMot				1	0,64**	0,69**	0,72**	0,68**	0,71**	0,28	0,27	0,26	0,48*	0,33	0,60**
VR					1	0,47*	0,86**	0,80**	0,82**	0,28	0,30*	0,24	0,23	0,23	0,58**
VM						1	0,50**	0,45*	0,45*	0,15	0,17	0,09	0,10	0,27	0,63**
VCL							1	0,93**	0,97**	0,31*	0,24	0,33*	0,10	0,15	0,40*
VSL								1	0,98**	0,64**	0,55**	0,63**	0,02	0,20	0,44*
VAP									1	0,50**	0,39*	0,56**	0,04	0,13	0,40*
LIN										1	0,93**	0,94**	-0,15	0,25	0,34*
STR											1	0,75**	-0,05	0,44*	0,33*
WOB												1	-0,19	0,07	0,30*
ALH													1	0,45*	0,19
BCF														1	0,28

Valores estatisticamente significativos quando *P < 0,05 e **P < 0,0001.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de antioxidantes adicionados a diluentes de refrigeração e congelação, assim como na dieta de garanhões, determina benefícios à capacidade fertilizante dos espermatozoides desses animais, porém ainda apresentam resultados controversos.

Desta forma, ressalta-se a importância da adição de diferentes concentrações dos antioxidantes GPx e cisteína aos diluentes de congelação do sêmen equino, assim como a realização de diferentes tempos de avaliação pós-descongelação, afim de buscar concentrações mais adequadas à melhoria da qualidade seminal de garanhões pós-descongelação, aumentando, assim, os índices reprodutivos da espécie. Além disso, constata-se a necessidade de realização de novos experimentos com adição de outros antioxidantes aos diluentes de congelação de sêmen equino, devido à diversidade de agentes oxidantes produzidos durante o processamento do sêmen.