

**MARIA SHÍRLEI RODRIGUES DE MORAES BARROS**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SÊMEN CAPRINO CRIOPRESERVADO  
EM DILUENTE ACRESCIDO DE SUPEROXIDO DISMUTASE E  
CATALASE EM  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

**RECIFE**

**2010**

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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SÊMEN CAPRINO CRIOPRESERVADO  
EM DILUENTE ACRESCIDO DE SUPEROXIDO DISMUTASE E  
CATALASE EM  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra

**RECIFE - PE**

**2010**

Ficha catalográfica

B277a Barros, Maria Shírlei Rodrigues de Moraes  
Avaliação *In vitro* do Sêmen caprino criopreservado em diluente acrescido de superóxido dismutase e catalase em diferentes concentrações / Maria Shírlei Rodrigues de Moraes Barros – 2010.  
69 f. : il.

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

Referência

1. Antioxidantes 2. Espermatozoides 3. Ultraestrutura Congelação 4. Caprino 5. Sêmen I. Guerra, Maria Madalena Pessoa, orientador II. Título

CDD 636. 08926

1. Avaliação

2. Espermatozoides

3. Congelação

4. Antioxidantes

I. Guerra, Maria Madalena Pessoa

II. Título

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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SÊMEN CAPRINO CRIOPRESERVADO  
EM DILUENTE ACRESCIDO DE SUPEROXIDO DISMUTASE E  
CATALASE EM  
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

Tese de Doutorado elaborada e defendida por

**MARIA SHÍRLEI RODRIGUES DE MORAES BARROS**

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2010

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra/UFRPE  
Orientadora

Dra. Marciane da Silva Maia/ EMBRAPA-RN

Prof. Dr José Ferreira Nunes/UECE

Dra Christina Alves Peixoto/Fiocruz-PE

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro/UFRPE

*Dedico aos meus pais, José Rodrigues e Sofia Moraes, que me proporcionaram amor, apoio familiar, educação, e sempre foram o meu exemplo de vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por ter concedido todas as condições para realização deste trabalho: saúde, vida, e, principalmente, um sentido para vivê-la. A Ele, a razão de todos os meus projetos;

Ao meu esposo Reginaldo Barros, companheiro em todos os momentos, aos meus filhos, Daniele Sofia, Ana Catarina, Thiago, Reginaldo Júnior, e a Nicolas, meu neto, presentes de Deus, por estarem sempre ao meu lado. **Eu os amo muito!**

À professora Maria Madalena Pessoa Guerra, que em todos os momentos transmitiu tranquilidade, confiança e serenidade, sempre disponível para compartilhar seus conhecimentos. MUITO OBRIGADA!

À Sildivane Valcácia Silva, PELA AMIZADE e por todas as vezes que respondeu as minhas dúvidas;

À turma do Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE. Especialmente Sildivane Valcácia Silva, Adriana Soares Trindade, André Mariano Batista, Felipe Costa Almeida, Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Júnior e Diogo Ribeiro Câmara, OBRIGADA PELA AMIZADE;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV);

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV);

À Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – EMEPA/PB, pela oportunidade de realizar o experimento. Aos funcionários de apoio, pela paciência e ajuda para a realização deste trabalho;

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife–PE, a Karina Alcântara Saraiva, Janaína Viana de Melo, e, especialmente, a Dra Christina Alves Peixoto, pela ajuda na avaliação da microscopia eletrônica;

Ao Laboratório de Tecnologia do Sêmen da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza-CE, pela avaliação da cinética espermática utilizando o sistema de análise computadorizado (CASA);

Ao CNPq, pela concessão de bolsa durante a realização do curso de Doutorado.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANOVA** = Análise de variância
- ALH** = Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
- BCF** = Frequência do Batimento Flagelar cruzado
- CASA** = Sistema computadorizado de avaliação da motilidade espermática
- CAT** = Catalase
- CuZnSOD** = Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
- DCF** = Diacetato de carboxifluoresceína
- DMSO** = Dimetilsulfóxido
- FITC-PNA** = Fluoresceína conjugado a Peanut aglutinin
- GSH-Px** = Glutathione peroxidase
- GSH** = Glutathione Reduzida
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** = Peróxido de hidrogênio
- IA** = Inseminação Artificial
- iAC** = Integridade de acrossoma
- iMP** = Integridade de Membrana Plasmática
- IP** = Iodeto de Propídio
- JC-1** = Iodeto de 5,5',6,6' tetracloro-1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolil
- LIN** = Linearidade
- LPO** = Lipoperoxidação
- MET** = Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MnSOD** = Superóxido dismutase dependente de manganês
- MET** = Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MP** = Motilidade Progressiva
- MT** = Motilidade Total
- O<sub>2</sub><sup>-</sup>** = Ânion superóxido
- OH<sup>·</sup>** = Radical Hidroxila
- PBS** = Tampão fosfato salina
- PMM** = Potencial da membrana mitocondrial
- ROS** = Espécies Reativas ao Oxigênio
- SOD** = Superóxido Dismutase
- STR** = Retilinearidade
- VAP** = Velocidade de Trajeto
- VCL** = Velocidade Curvilínea
- VSL** = Velocidade Linear Progressiva
- WOB** = Índice de oscilação



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>2.1 Congelação do sêmen</b> .....	14
<b>2.2 Espécies reativas do oxigênio (ROS)</b> .....	15
<b>2.3 Estresse oxidativo</b> .....	16
<b>2.4 Antioxidantes</b> .....	18
2.4.1 Antioxidantes enzimáticos.....	19
2.4.2 Antioxidantes não enzimáticos.....	21
<b>2.5 Adição de substâncias antioxidantes ao sêmen</b> .....	22
<b>2.6 Avaliação espermática</b> .....	23
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	26
<b>4 ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	36
<b>4.1 Análise estrutural e ultraestrutural de espermatozoides caprinos criopreservados em leite desnatado acrescido de glicerol, superóxido dismutase e catalase</b> .....	37
<b>4.2 Potencial de membrana mitocondrial e cinética de espermatozoides caprinos criopreservados em leite desnatado acrescido de glicerol, superóxido dismutase e catalase</b> .....	54
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	71

## RESUMO

Objetivou-se com esse estudo avaliar o potencial de membrana mitocondrial (PMM), cinética, estrutura e ultraestrutura de espermatozoides caprinos, submetidos à criopreservação com diluente à base de leite desnatado e glicerol (7%), suplementado com superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), em diferentes concentrações. Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Boer, submetidos à colheita de sêmen com vagina artificial. As amostras de sêmen foram diluídas em leite desnatado acrescido de glicerol (7%), de forma a apresentar  $320 \times 10^6$  espermatozoides/mL, e suplementados com antioxidantes de acordo com os grupos experimentais: G1) diluente (Controle); G2) diluente + SOD 25 U/mL; G3) diluente + SOD 50 U/mL; G4) diluente + SOD 100 U/mL; G5) diluente + CAT 25 U/mL; G6) diluente + CAT 50 U/mL; G7) diluente + CAT 100 U/mL e G8) diluente + SOD 100 U/mL + CAT 25 U/mL. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em palhetas (0,25 mL), congeladas e armazenadas em botijão criobiológico (-196° C). Após descongelação (37 °C/30 segundos), alíquotas de sêmen de cada grupo foram avaliadas quanto a PMM, cinética (CASA), iMP, iAc e ultraestrutura (microscopia eletrônica de transmissão). Não se constatou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais dos parâmetros PMM, iMP, iAc e cinética espermática. Na avaliação ultraestrutural, espermatozoides *in natura* apresentaram-se morfolologicamente preservados, principalmente na membrana mitocondrial. A análise das células pós-descongelação evidenciou maior quantidade de danos no acrossoma, todavia em menor percentual nas células do G8. O G7 apresentou dano ultraestrutural no acrossoma de 92,31% dos espermatozoides avaliados. Em contrapartida, grande porcentagem de espermatozoides apresentaram membrana plasmática e acrossomal intactas, principalmente nos grupos G2, G4, e G8. Com base nos resultados de ultraestrutura, é possível recomendar a adição de SOD (100U/mL) e CAT (25 U/mL) ao diluente de congelação do sêmen caprino à base de leite desnatado e glicerol; assim como outros estudos devem ser realizados utilizando concentrações maiores do que 100U/mL de SOD neste diluidor de congelação de sêmen caprino, associado à avaliação *in vivo* da ação deste antioxidante.

**Palavras-chave:** Análise computadorizada, sêmen, ROS, catalase, superóxido dismutase

## ABSTRACT

*With the objective of to evaluate mitochondrial membrane potential (MMP), kinetic, the structural and ultrastructural of goat sperm submitted to freezing in skimmed-milk and glycerol, superoxide dismutase and catalase. It was used five bucks of Boer race, submitted to semen collect by artificial vagina. Semen samples were diluted in skimm-milk plus glycerol (7%), aiming have  $320 \times 10^6$  sperm/mL, supplemented with antioxidants according to the experimental groups: G1) extender (control), G2) extender SOD + 25 IU/mL; G3) extender + SOD 50 IU/mL; G4) extender + SOD 100 IU/mL; G5) extender + CAT 25 IU/mL; G6) extender + CAT 50 IU/mL; G7) extender + CAT 100 IU/mL and G8) extender + SOD 100 IU/mL + CAT 25 IU/mL. Then the samples were packed in straws (0.25 mL), frozen and stored in cold storage cylinder (-196 °C). After thawing (37 °C/30 seconds), aliquots of semen frozen/thawed of each group were evaluated to PMM, kinetic (CASA), structure and ultrastructure of spermatozoa, where did not observe significant difference ( $P > 0.05$ ) among experimental groups in parameters PMM, kinetic, iMP and iAc. In ultrastructural evaluation, fresh sperm was morphologically preserved mainly on mitochondrial membrane. Analyzes of thawed cells showed greater quantity of damages on acrosome; however, in lower percentage on G8 cells. G7 cells showed ultrastructural damages in acrosomes of 92.31% of spermatozoas. In contrast, great percentage of spermatozoa have plasma and acrossomal membranes intact, mainly on G2, G4 and G8 groups. Based on the ultrastructural results, it can be recommended addition of SOD (100 U/mL) and CAT (25 U/mL) on the freezing goat semen diluents with skimmed-milk and glycerol; as well as other studies should be realized using higher concentrations than 100U/mL of SOD in this diluent to freezing goat semen, associated to in vivo evaluation of these antioxidant action.*

**Keywords:** *Computadorized analysis, semen, ROS, catalase, superoxide dismutase.*

## 1 INTRODUÇÃO

A região Nordeste do Brasil possui o maior rebanho de caprinos do país, correspondendo a 91% do efetivo nacional (IBGE, 2008), gerando riquezas que antes não eram valorizadas, como a qualidade nutricional da carne e do leite caprino. Embora numericamente expressivo, o rebanho caprino no Semiárido apresenta desempenho acentuadamente reduzido, condicionado pelo baixo nível tecnológico que caracteriza seu sistema de produção (GUIMARÃES FILHO et al., 2000), apresentando uma forma de criação predominantemente extensiva e com baixa performance produtiva e reprodutiva.

A eficiência reprodutiva é o parâmetro que contribui para o aumento da produtividade dos rebanhos, e, entre outros fatores, é fortemente influenciado pelo ambiente, pela genética e pelo regime de manejo (SIMPLICIO e SANTOS, 2005). Em regiões temperadas, a estacionalidade reprodutiva dos animais é atribuída à combinação entre fotoperíodo e temperatura, enquanto em regiões de clima tropical e subtropical esta parece estar mais relacionada à chuva e a seu efeito na quantidade e na qualidade da forragem (REGE et al., 2000).

A inseminação artificial (IA) tem um importante papel na criação de caprinos, especialmente em sistemas intensivos de produção, facilitando o controle reprodutivo e auxiliando na realização de testes de progênie mais precisos e em menor espaço de tempo (LEBOEUF et al., 2000), proporcionando o rápido e seguro melhoramento genético, uma vez que os reprodutores doadores de sêmen devem ser geneticamente superiores.

O sêmen caprino pode ser usado *in natura* (puro ou diluído), refrigerado ou criopreservado. O sêmen *in natura* e o refrigerado apresentam fertilidade mais elevada, porém de uso restrito ao período de atividade sexual dos machos, haja vista ser o caprino uma espécie que, em determinadas regiões, apresenta estacionalidade reprodutiva em virtude do fotoperíodo. Entretanto, o sêmen criopreservado pode ser mantido por um longo período, quando armazenado em nitrogênio líquido, apresentando maior aplicabilidade (TRALDI, 2006).

A criopreservação do sêmen altera as características das membranas dos espermatozoides, interferindo na sua capacidade fertilizante. O processo de preservação do sêmen, especialmente a congelação, causa danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais nos espermatozoides e reduz a motilidade e a viabilidade, impedindo o trânsito espermático no

trato reprodutivo feminino e, conseqüentemente, prejudicando a fertilidade (LEBOEUF et al., 2000).

Todos os organismos aeróbicos requerem oxigênio para a sua sobrevivência. Porém, embora o oxigênio seja um elemento essencial, seus metabólitos, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) são capazes de modificar o funcionamento celular de forma adversa, comprometendo mecanismos e arriscando a sobrevivência da célula (DONNELLY et al., 1999). O reduzido conhecimento da ação dos oxidantes encontrados no sêmen dos animais domésticos talvez seja responsável pelos ineficientes resultados obtidos após os procedimentos de criopreservação em algumas espécies e posterior utilização em técnicas de reprodução assistida, como inseminação artificial e fertilização *in vitro*.

Sabe-se, no entanto, que vários mecanismos de defesa antioxidante estão envolvidos nos sistemas biológicos, e que o equilíbrio entre os benefícios e os riscos das espécies reativas de oxigênio (ROS) e antioxidantes, *in vivo* e *in vitro*, parece ser necessário para o funcionamento reprodutivo normal (SOARES e GUERRA, 2009). A criopreservação do sêmen aumenta a produção de ROS, bem como diminui as defesas antioxidantes do sêmen (BAUMBER et al., 2005). No entanto, a literatura é escassa no que se refere à utilização de antioxidantes em meios diluidores utilizados em biotecnologias da reprodução de caprinos (CASTILHO, 2008).

O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação com diluente à base de leite desnatado contendo os antioxidantes enzimáticos superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), em diferentes concentrações.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Congelação do sêmen

Os procedimentos de criopreservação do sêmen de muitas espécies são considerados ineficientes, em decorrência de grande número de células espermáticas tornarem-se aparentemente inférteis após a congelação/descongelação. Comparado ao sêmen fresco, uma quantidade oito vezes maior de células espermáticas criopreservadas de bovinos são necessárias para se obter a mesma taxa de fertilidade (SHANNON e VISHWANATH, 1995).

Acredita-se que as injúrias causadas pelo procedimento de criopreservação interfiram no transporte e na sobrevivência espermática no sistema genital da fêmea (SALAMON e MAXWELL, 1995). A membrana plasmática do espermatozoide é considerada o local primário de danos durante a criopreservação (WATSON, 1995). Alguns estudos têm demonstrado que o efeito osmótico e da temperatura, determinados pelos procedimentos de congelação e descongelação, induzem grandes alterações no volume de água da célula, resultando em considerável estresse mecânico nas membranas celulares (NOILES et al., 1995).

Pesquisas evidenciaram que o procedimento de criopreservação afeta a composição lipídica e organizacional da membrana plasmática dos espermatozoides, determinando assimetria dessa bicamada fosfolipídica, resultando em danos ultra-estruturais e predispondo os espermatozoides a defeitos morfológicos, como perda ou anormalidade do acrossoma (HINKOVSKA-GALCHEVA et al., 1989).

Apesar da preservação da motilidade, espermatozoides criopreservados exibem danos na membrana plasmática (CHECK e CHECK, 1991), que afetam os processos de capacitação e hiperativação espermática, bem como de fertilização (WATSON, 1995). As modificações na distribuição e nos componentes da membrana espermática, ocasionam desestabilização semelhante àquela que ocorre no processo de capacitação espermática, e podem ser devido ao processamento do sêmen ou a composição dos diluidores (PÉREZ et al., 1996). A criopreservação antecipa a maturação das membranas espermáticas, aumentando a proporção de espermatozoides capacitados ou com o acrossomo reagido, quando comparados aos do sêmen *in natura* (MAXWELL e WATSON, 1996). Como consequência, reduz a sobrevivência espermática em virtude das células capacitadas serem precocemente ativadas e morrerem em curto período de tempo, antes de atingirem o local de fertilização (WATSON,

1995). Por conseguinte, os danos ocorridos durante a criopreservação dependem da estabilidade estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides (De LEEUW et al., 1993).

Entre espécies, as diferenças na sensibilidade espermática observadas durante o procedimento de refrigeração são amplamente atribuídas à variação na composição da membrana, como, por exemplo, a relação entre ácidos graxos saturados e insaturados (NOILES et al., 1995). Durante os procedimentos de criopreservação, a irreversível redução na motilidade, na integridade morfológica e na capacidade fertilizante dos espermatozoides pode também ser determinada pelo acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo celular ou, principalmente, pelo aumento da produção de ROS decorrente da redução do oxigênio, como por exemplo, radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (MISRA e FRIDOVICH, 1972; WANG et al., 1997; BAUMBER et al., 2003).

## **2.2 Espécies reativas do oxigênio (ROS)**

As moléculas de oxigênio diatômico na atmosfera terrestre são as maiores promotoras de reações nas células vivas. Exceto aqueles organismos que são especialmente adaptados para viver sob condições anaeróbicas, todos os animais e plantas requerem oxigênio para a eficiente produção de energia (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do seu metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se no centro dos átomos de oxigênio, são denominados de ROS (BARREIROS e DAVID, 2006). Normalmente, o oxigênio molecular tem dois elétrons desemparelhados e essa estrutura eletrônica torna o oxigênio particularmente suscetível à formação de radicais (WARREN et al., 1987). Isso determina uma atração para um campo magnético, o que pode torná-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (SHAMI e MOREIRA, 2004). Desta forma, a produção de radicais livres constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

As ROS podem ser produzidas no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de

formação (YU e ANDERSON, 1997), sendo que a principal fonte produtora destas ROS é a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons (MOLINA, 2003).

As principais fontes endógenas produtoras de ROS incluem as mitocôndrias e a atividade de algumas enzimas como: xantina oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminoxidases, as enzimas envolvidas na via de produção de prostaglandinas e tromboxanos e a NADPH-oxidase da membrana plasmática de macrófagos, que produzem uma grande quantidade de ROS em resposta ao estímulo fagocitário (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1989; BLAKE, 1995).

A adição de um elétron extra ao oxigênio molecular ( $O_2$ ) forma o  $O_2^-$ , a forma primária das ROS, que pode ser convertido direta ou indiretamente em ROS secundária, como o  $OH^-$  e o  $H_2O_2$  (WARREN et al., 1987).

O termo ROS se refere aos radicais livres ou espécies reativas do oxigênio, tais como  $O_2^-$ ,  $OH^-$  e  $H_2O_2$ . Este último não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio, extremamente deletério, que pode causar injúria oxidativa em membranas lipídicas, proteínas transmembranas e carboidratos, danificando ácidos nucleicos e despolimerizando ácidos hialurônicos (OCHSENDORF, 1999).

Vários estudos têm demonstrado que os espermatozoides são capazes de produzir quantidades controladas de ROS endógeno, com o objetivo de induzir a capacitação espermática e a reação do acrossoma, promovendo a sua habilidade fertilizante (De LAMIRANDE e GAGNON, 1995; RIVLIN et al., 2004). Em contrapartida, elevadas concentrações de ROS prejudicam a motilidade, a viabilidade e a função espermática através de sua interação com lipídios da membrana, proteínas, DNA mitocondrial e nuclear (HELLSTROM et al., 1994).

### **2.3 Estresse oxidativo**

A existência de um desequilíbrio, em favor da geração excessiva de radicais livres, ou em detrimento da velocidade de remoção destas espécies, é conhecida como estresse oxidativo e pode conduzir à oxidação maciça de substratos biológicos (LUCESOLI e FRAGA, 1995).

O estresse oxidativo é definido como um acúmulo de ROS que causa danos à estrutura das biomoléculas de DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares. Este processo é altamente variável devido às concentrações de antioxidantes.



Algumas enzimas neutralizam as ações das ROS, como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), as quais estão presentes no espermatozoide e no plasma seminal humano, assim como em outras espécies (ALVAREZ et al., 1987; GUERRA et al., 2004).

O dano oxidativo de biomoléculas pode levar à inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana, ao aumento na aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade e à morte celular. Estes efeitos tóxicos do oxigênio têm sido associados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças crônicas, inflamatórias e degenerativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

A possível explicação para a ocorrência de danos por excesso de ROS se baseia no fato de que as membranas espermáticas de mamíferos são ricas em ácidos graxos poliinsaturados que a tornam muito fluida e, ao mesmo tempo, muito suscetível a danos peroxidativos induzidos pelas ROS (SIKKA et al., 1982).

Os ácidos graxos poliinsaturados contêm a configuração de  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ , em que o hidrogênio no átomo de carbono central é facilmente removido, resultando na formação de um radical livre. Se esses radicais livres não forem neutralizados rapidamente por um antioxidante, poderão criar outros radicais livres ainda mais voláteis ou causar danos à membrana celular, à parede dos vasos sanguíneos, às proteínas, às gorduras ou ao núcleo de DNA das células (DIPLOCK, 1991).

Os espermatozoides mamíferos são as únicas células que consistem de partes distintas estrutural e funcionalmente, cercados por uma membrana plasmática contínua (FLESCHE e GADELLA, 2000). A estrutura celular única dos espermatozoides os torna particularmente sensíveis ao estresse oxidativo. Em condições normais, as células somáticas contêm substâncias antioxidantes em seu citoplasma, porém o espermatozoide, durante o período de maturação, perde a maioria de seu citoplasma, e com isto, perde parte dos antioxidantes endógenos, ficando vulnerável à ação de ROS (ALVAREZ et al., 1987; ZINI et al., 1993). Como todas as células vivas, sob condições aeróbicas, os espermatozoides também produzem ROS originadas, principalmente, de sua atividade metabólica normal, sendo importante para a capacitação, regulação da taxa de hiperativação, ocorrência da reação acrossômica e fusão espermatozoide/oócito (De LAMIRANDE et al., 1998; AITKEN et al., 2004;). As ROS cumprem uma importante função na fisiologia espermática, mas o desequilíbrio entre sua produção e degradação causa efeitos adversos sobre os espermatozoides (BALL et al., 2002). Assim, níveis excessivos de ROS podem ter impacto negativo na sua qualidade. É necessário manter um equilíbrio entre a produção de ROS e a proteção de antioxidantes para assegurar a normalidade da função espermática (CASTELLINI et al., 2002).

Os espermatozoides são vulneráveis aos efeitos tóxicos do estresse oxidativo ocorrido durante a criopreservação (BROUWERS et al., 2005). Os eventos ocorridos durante esse processo envolvem redução da temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento (MEDEIROS et al., 2002). Estes procedimentos ocasionam danos celulares devido a mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozoide, lesões no DNA, estresse osmótico além da toxicidade dos crioprotetores (BALL et al., 2002). A conservação de espermatozoides requer uma redução ou atraso do metabolismo das células espermáticas para gerar o prolongamento da sua vida (YOSHIDA, 2000).

## 2.4 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000), podendo agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O sistema antioxidante representa a defesa dos organismos contra as ROS e é constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ . Existem também as defesas secundárias que impedem a propagação da lipoperoxidação (LPO), e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (YU, 1994).

Desta forma, em condições normais, a concentração das ROS dentro das células é extremamente baixa, pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem, ou impedem sua formação (MATES et al., 1999; GUERRA et al., 2004).

O radical  $O_2^-$ , produzido a partir da molécula de oxigênio pela adição de um elétron, apesar de ser um radical livre, não é altamente reativo, pois não consegue penetrar em membranas celulares, ficando restrito ao compartimento onde é produzido (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG e ARNÉR, 2001). Este oxidante pode ser encontrado em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

A maior parte do oxigênio consumido é convertida em  $H_2O_2$  por dismutação do  $O_2^-$ , de forma espontânea ou pela ação da SOD. Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o  $H_2O_2$  é um metabólito extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxila (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

O  $H_2O_2$  é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo, por ser capaz de transpor facilmente as membranas celulares (BARREIROS e DAVID, 2006), agindo como intermediário na formação de mais moléculas de ROS, que, ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro ou do cobre, produz o  $OH^-$ , um dos mais reativos (ROVER JÚNIOR et al., 2001) e mais deletérios ao organismo, pois devido a sua meia vida muito curta dificilmente pode ser inativado *in vivo* (BARREIROS e DAVID, 2006).

Os peróxidos podem se romper para formar dois radicais livres, resultando numa reação em cadeia autopropagadora. Os antioxidantes atuam fornecendo hidrogênio para o radical livre estabilizando-o. O antioxidante torna-se um radical livre, mas tem a propriedade de poder se reajustar em um conjunto estável e, dessa maneira, interromper a reação de propagação (SWENSON et al., 1996). A remoção do  $H_2O_2$  é feita por três sistemas enzimáticos antioxidantes, catalase, glutathione peroxidase e peroxiredutases (NORDBERG e ÁRNER, 2001).

Em condições normais, os mecanismos antioxidativos celulares, presentes em quase todos os tecidos e suas secreções, são responsáveis por inibir a elevada produção de ROS, protegendo as células de danos oxidativos (JONES et al., 1979). No entanto, enzimas antioxidantes intracelulares, não conferem proteção total à membrana plasmática que envolve o acrossoma e a cauda, forçando os espermatozoides a suplementarem essa limitada defesa intrínseca, com a proteção conferida pelo plasma seminal, o qual contém antioxidantes enzimáticos (ALVAREZ e STOREY, 1989; ZINI et al., 1993), além de uma variedade de antioxidantes não enzimáticos (SALEH e AGARWAL, 2002).

#### 2.4.1 Antioxidantes enzimáticos

A produção das enzimas antioxidantes, porém, requer a presença de níveis adequados de minerais como zinco, cobre e selênio, além de quantidades suficientes de proteínas de alta qualidade e vitaminas. Tanto o cobre quanto o zinco são particularmente importantes para a

produção da superóxido dismutase (SOD) dentro da mitocôndria, onde a maior parte dos radicais livres é produzida, e o selênio é essencial para a formação da glutathiona peroxidase (BIANCHI, 1999).

Nas células eucarióticas existem duas SODs principais, uma citoplasmática, que contém cobre e zinco, denominada de superóxido dismutase cobre-zinco dependente - CuZnSOD, é muito estável e parece estar presente em praticamente todas as células eucarióticas (plantas ou animais), e outra localizada na matriz mitocondrial, que contém Manganês, denominada Superóxido dismutase manganês dependente - MnSOD (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Segundo Yu, (1994) existe também a SOD ferro dependente, que ocorre em bactérias. A importância da SOD pode ser demonstrada pelo fato de ser a enzima mais abundante do organismo, ao mesmo tempo que também é a quinta proteína mais abundante neste mesmo organismo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). A atividade da MnSOD em relação a CuZnSOD, depende do tecido e das espécies onde atuam.

Glutathiona, um tripeptídeo (g-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (MEISTER e ANDERSON, 1983). Quatro diferentes tipos de glutathiona peroxidases são conhecidas, dentre as quais a fosfolípídeo hidropéroxido glutathiona peroxidase (PHGSH-Px), que consegue promover a redução de hidropéroxidos a partir de complexos lipídicos como colesterol, mesmo quando os peróxidos estão presentes na membrana celular (LEHMANN et al., 1998).

A catalase é uma enzima encontrada no peroxissomos que se encarrega de fazer a conversão de elevadas concentrações de  $H_2O_2$  em água e oxigênio, completando assim a reação iniciada pela SOD (TREMELLEN, 2008). A catalase capta o peróxido de hidrogênio e o decompõe em oxigênio e água antes que ele possa formar radicais hidroxilas. O oxigênio e a água produzidos nesse processo são reutilizados pelas células, como parte do metabolismo normal. A catalase atua apenas nas porções aquosas da célula, portanto, as partes lipídicas como a membrana celular permanece desprotegida e suscetível à ação dos peróxidos de hidrogênio (FERREIRA e FANHANI, 2006).

Quando o peróxido de hidrogênio está presente em reduzidas concentrações (condições fisiológicas normais), a glutathiona peroxidase é que se encarrega de transformá-lo em água (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

#### 2.4.2 Antioxidantes não enzimáticos

Os Antioxidantes não enzimáticos, em sua maioria são exógenos, ou seja, necessitam ser absorvidos pela alimentação. Dos componentes não enzimáticos da defesa antioxidante destacam-se alguns minerais (cobre, manganês, zinco, selênio e ferro), vitaminas (ácido ascórbico, vitamina A e E), carotenóide (beta caroteno, licopeno e luteína), bioflavonoides (genistéina, quercetina) e taninos (catequina) (PAPAS, 1999).

A vitamina A tem pouca ação antioxidante e é incapaz de agir sobre o oxigênio singlet, mas seu precursor, o beta-caroteno, é o mais eficiente ligante desta forma reativa de oxigênio, encontrada na natureza e pode agir como antioxidante. O beta-caroteno, um pigmento presente em todas as plantas, pode ser encontrado em membranas celulares, inclusive nos lipossomos (MACHLIN e BENDICH, 1987).

As estruturas celulares não são protegidas totalmente por antioxidantes endógenos, e é bem estabelecido que, antioxidantes obtidos da dieta são indispensáveis para a defesa contra a oxidação e, portanto, têm importante papel na manutenção da saúde.

Os carotenóides, guardando os devidos potenciais antioxidantes, impedem a propagação da reação, servindo como substrato para as ROS ou produtos desencadeantes, provenientes de uma reação de uma ROS com um substrato, para que não sejam formados novos produtos desencadeantes que dariam continuidade à reação em cadeia (GOMES, 2007). Estes antioxidantes reagem com os radicais livres, notavelmente com os peróxidos e com o oxigênio molecular, sendo a base de sua ação antioxidante. Carotenóides como o beta-caroteno, licopeno, zeaxantina e luteína, exercem funções antioxidantes em fases lipídicas, bloqueando os radicais livres que danificam as membranas lipoprotéicas (SIES e STAHL, 1995).

O ácido ascórbico reduz ROS/RNS em leucócitos ativados no pulmão e mucosa gástrica. No trato respiratório pode reagir rapidamente com poluentes do ar, como O<sub>3</sub>, fumaça de cigarro e NO<sub>2</sub>. Além de eliminar diretamente ROS/RNS, regenera o  $\alpha$ -tocoferol e, portanto, participa do mecanismo protetor contra a lipoperoxidação. Uma vez que a vitamina C é consumida durante a reação, outros compostos antioxidantes (ácido úrico e proteínas contendo tiol) podem reduzir o radical  $\alpha$ -tocoferila, mas de forma menos eficiente (AMES, 2001).

A vitamina E (tocoferol) é o principal antioxidante lipossolúvel nas membranas celulares. Protege contra a oxidação lipídica por atuar diretamente sobre radicais livres derivados do oxigênio. A vitamina C interage com o tocoferol, regenerando o tocoferol

reduzido, e desta forma, a relação vitamina C:vitamina E pode ser biologicamente mais importante do que os níveis absolutos de vitamina C (CLARKSON, 1995).

## 2.5 Adição de substâncias antioxidantes ao sêmen

Substâncias antioxidantes têm sido adicionadas a diluentes do sêmen, com o objetivo de reduzir os danos oxidativos causados pela elevada concentração de ROS em amostras de sêmen de bovinos (BECONI et al., 1993; BILODEAU et al., 2001; FOOTE et al., 2002), ovinos (MAXWELL e STOJANOV, 1996; UPRETI et al., 1997; MONTEIRO Jr et al., 2006; TAQUEDA et al., 2006), caprinos (SINHA et al., 1996), suínos (PEÑA et al., 2003; ROCA et al., 2004), equinos (BALL et al., 2001; SILVA et al., 2006) e caninos (COLETO et al., 2006abc). No entanto, resultados contraditórios têm sido observados com o uso destas substâncias na preservação da viabilidade espermática do sêmen *in natura*, refrigerado e congelado, em virtude da divergência do tipo e da concentração do antioxidante utilizado (MAXWELL e STOJANOV, 1996; UPRETI et al., 1997; DONELLY et al., 1999).

Nos últimos anos o principal foco das pesquisas relacionadas aos radicais livres, é a caracterização das enzimas reguladoras e seus respectivos substratos referentes aos sistemas de defesa antioxidantes e suas funções metabólicas (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Estudos demonstraram efeito positivo da adição de Glutathione ao sêmen equino (BALL et al., 2001), caprino (SINHA et al., 1996) e bovino (SLAWETA et al., 1988). Em carneiros, Maxwell e Stojanov (1996) ressaltaram que antioxidantes hidrossolúveis (SOD, CAT, Citocromo c e Glutathione peroxidase) foram hábeis em preservar a sobrevivência e a integridade do acrossoma dos espermatozoides durante a refrigeração.

Ressalta-se, entretanto, que apesar da importância dos antioxidantes enzimáticos na proteção contra os danos oxidativos aos espermatozoides, muitas pesquisas também utilizam substâncias antioxidantes não enzimáticas, como taurina, trealose, selênio e compostos surfactantes, visando aumentar a motilidade, a viabilidade e a integridade da membrana dos espermatozoides (EL-ALAMY e FOOTE, 2001; AISEN et al., 2002).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos utilizados na composição dos diluentes de sêmen destaca-se a trealose, que é um dissacarídeo que possui ação protetora contra o efeito osmótico e interação específica com fosfolípídeos da membrana, tornando o meio hipertônico, causando desidratação da célula antes da congelação e reduzindo a quantidade de injúria celular determinada pela cristalização do gelo (SCHMEHL et al., 1986; STOREY e NOILES,

1998). A taurina é um dos aminoácidos presentes na composição do fluido epididimário, possuindo ação protetora contra o acúmulo de ROS em casos de exposição a condições aeróbicas e ao processo de congelação/descongelação (HOLMES et al., 1992; ALVAREZ e STOREY, 1983; CHEN et al., 1993).

## 2.6 Avaliação espermática

A avaliação efetiva do sêmen foi constantemente apontada como o fator chave no desenvolvimento de metodologias que garantam a maior utilização reprodutiva dos machos das espécies em perigo de extinção e também das espécies economicamente importantes (BACCETTI et al., 1997).

Todos os testes laboratoriais de análise de sêmen buscam a predição da capacidade fertilizante do espermatozoide. Dentre esses exames, a técnica que utiliza sondas fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células e de detectar sua integridade estrutural ou funcional (CELEGHINI, 2005). A fluorescência é um indicador sensível e específico do estado de certas moléculas (oxidadas x reduzidas, ionizada x não ionizadas e livres x ligadas), podendo ser aplicada como forma de avaliar mudanças metabólicas dentro das células vivas (HAUGLAND, 2001).

Visando avaliar a viabilidade dos espermatozoides *in natura* ou criopreservados, tem-se utilizado a associação de vários testes, em virtude de não existir um único teste *in vitro* que seja capaz de mensurar todas as funções espermáticas. Assim, deve-se considerar que quanto maior o número de características avaliadas, mais exata será a estimativa da capacidade fertilizante dos espermatozoides (CARDOSO et al., 2005).

Com o propósito de obter uma técnica que demonstre maior repetibilidade tanto para a motilidade quanto para a morfometria, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e utilizados. Por conseguinte, programas computadorizados para a avaliação espermática podem ser mais objetivos e conferir maior repetibilidade às análises do que a habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de normalidade espermáticas. O poder de análise deste tipo de teste é dado pela avaliação precisa e acurada dos espermatozoides com alto grau de objetividade, podendo, assim, aperfeiçoar o processo de avaliação seminal dos animais (ARRUDA, 2000).

A utilização do método computadorizado de análise espermática (CASA), com base na qualidade individual desse gameta, oferece um cálculo acurado de diferentes parâmetros

celulares, incluindo concentração, motilidade e morfologia espermática, possibilitando a aquisição posterior de imagens digitalizadas, além de comparação entre trabalhos desenvolvidos em diferentes centros de pesquisa (IGBAL e HUNTER, 1995; MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002).

Através da imagem digitalizada de cada célula, o sistema CASA avalia, através de processos analíticos, as propriedades de locomoção dos espermatozoides, incluindo velocidade curvilínea (VCL), que consiste na distância total percorrida pela cabeça do espermatozóide, em unidade de tempo; amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH); frequência de batimentos do flagelo (BCF), que é a análise do deslocamento da cabeça espermática durante o percurso médio desenvolvido pela célula; velocidade média (VAP), que corresponde à velocidade média da célula; velocidade em linha reta (VSL), que representa a velocidade média, medida em linha reta, do início ao término do trajeto espermático; e linearidade (LIN), que consiste na média de VSL/VCL em porcentagem (BOYER et al, 1989; IGBAL e HUNTER, 1995; ESHRE, 1998).

Alguns pesquisadores têm ressaltado que os resultados obtidos com VCL e VAP podem ser utilizados para previsão da capacidade fertilizante do espermatozoide, em virtude tanto da importância da capacitação no processo de fertilização, quanto pelo fato de que esses parâmetros (VCL e VAP) são aumentados durante essa fase de preparação espermática para o processo de fertilização. Uma vez que a capacitação é seguida pela hiperativação, a identificação de espermatozoides hiperativados é de fundamental importância, tendo sido observado em amostras de sêmen com boa capacidade de fertilização (TARDIF et al., 1996; MORTIMER, 1997; GREEN e FISHEL, 1999; MORTIMER, 2000).

Na espécie ovina, Mortimer e Maxwell (1999) definiram, através da análise computadorizada dos espermatozoides, que as células hiperativadas apresentam  $VCL > 250.0 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $VSL \leq 100.0 \mu\text{m s}^{-1}$ ,  $LIN \leq 30\%$  e  $ALH_{\text{max}} \geq 9.0 \mu\text{m}$ , possibilitando, através da análise desses dados, prever a capacidade fertilizante desses gametas.

Quando os defeitos morfológicos se expressam por alterações em escala nanométrica (nm), ocorrem falhas nos métodos tradicionais de avaliação, havendo a necessidade do uso da microscopia eletrônica (JOSHI, 2001), de transmissão e de varredura, que são consideradas ferramentas de diagnóstico complementar para avaliação qualitativa dos espermatozoides, e contribuem para a melhor indicação da fertilidade espermática (HASHIDA et al., 2005).

Desta forma, a análise ultraestrutural dos espermatozoides permite identificar modificações sutis, que seriam imperceptíveis ao microscópio de luz (SILVA et al., 2007).



Segundo Burgess et al. (2001), a análise ultraestrutural da célula espermática é capaz de identificar lesões severas das membranas plasmáticas e acrossomal externa, caracterizadas por edema, ondulação e perda do conteúdo acrossomal.

Da mesma forma, Rodrigues-Martinez et al. (1993) observaram, através da análise ultraestrutural, que espermatozoides de cães, submetidos à congelação apresentam grande percentual de danos no acrossoma, incluindo perda do conteúdo, rarefação e edemaciação, perda de material eletrodense e vesiculação da membrana acrossomal. Porém, a plasmalema aparentemente, permanece íntegra na maioria dos casos. Segundo esses autores, tal fato pode ser a razão para a baixa porcentagem de anormalidades no acrossoma, normalmente, identificadas através da microscopia de contraste de fase.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J.; RYAN, A.L.; BAKER, M. A.; McLAUGHLIN, E.A. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 36, p. 994-1010, 2004.

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, v. 57, p. 1801-1808, 2002.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research*, v. 23, p. 77-90, 1989.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biology of Reproduction*, v. 29, p. 548-555, 1983.

ALVAREZ, J.G.; TOUCHSTONE, J.C.; BLASCO, L.; STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*, v. 8, p. 338-348, 1987.

AMES, B.N. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutation Research Amsterdam*, v. 475, n. 1-2, p. 7-20, 2001.

ARRUDA, R.P. *Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)*. 2000. 121p. Tese de Livre Docência (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo).

BACCETTI, B.; BERGAMINI, M.; BERNIERI, G. Submicroscopic mathematical evaluation of spermatozoa in assisted reproduction. The bovine fertilization (Notulae seminologicae). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, v. 29, n. 4, p. 563-582, 1997.

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, p. 508-515, 2001.

BALL, B.A.; BAUMBER, J.; SABEUR, K. Role of reactive oxygen species on normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 58, p. 299-300, 2002.

- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2003.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assesment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research*, v. 66, p. 772-779, 2005.
- BECONI, M.T.; FRANCA, C.R.; MORA, N.G. et al. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, v. 40, p. 841-851, 1993.
- BIANCHI, M.L. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, v. 12, n. 2, p.123-130, 1999.
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C. et al. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v. 56, p. 275-286, 2001.
- BLAKE, D.; WINYARD, P. G. *Immunopharmacology of Free Radical Species*. New York: Academic Press. 1995, p 301.
- BOYER, S.P.; DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics and Gynecology*, v. 12, p. 167- 200, 1989.
- BROUWERS, J.F.; SILVA, P.F.N.; GADELA, B.M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze thawing. *Theriogenology*, v. 63, p. 468-469, 2005.
- BURGESS, C.M.; BREDL, J.C.S.; PLUMMER, J.M. et al. Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 57, p. 357-363, 2001.
- CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. *Animal Reproduction Science*, v. 92, p. 384-391, 2005.
- CASTELLINI, C.; LATTAIOLI, P.; DAL BOSCO, A. et al. Effect of supranutritional level of dietary  $\alpha$ -tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. *Theriogenology*, v. 56, p. 1723-1732, 2002.

CASTILHO, E.F. *Uso da própolis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino*. 2008. 63f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

CELEGHINI, E.C.C. *Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes*. 2005. 186f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHECK, M.L.; CHECK, J.H. Poor hypo-osmotic swelling test results from cryopreserved sperm despite preservation of sperm motility. *Archives of Andrology*, v. 26, p. 37-41, 1991.

CHEN, Y.; FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, v. 30, p. 423-431, 1993.

CLARKSON, P.M. Antioxidants and physical performance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 35, n. 1/2, p. 131-141., 1995.

COLETO, Z.F.; SOUZA, A.F.; BERINSON, K.M. et al. Efeito da adição de diferentes concentrações de vitamina C e Trolox ao sêmen criopreservado de cães. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 3, Belém, 2006. *Anais...*, Belém, 2006a. CDROOM.

COLETO, Z.F.; SOUZA, A.F.; JASSET, P.F. et al. Viabilidade pós-criopreservação do sêmen canino diluído em Tris-gema ou Kenney, suplementado com antioxidante. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 3, Belém, 2006. *Anais...*, Belém, 2006b. CDROOM.

COLETO, Z.F.; SOUZA, A.F.; MOURA, C.S. et al. Efeito da adição de vitamina C e Trolox na viabilidade de espermatozoides criopreservados de cães, utilizando duas curvas de congelamento. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 3, Belém, 2006. *Anais...*, Belém, 2006c. CDROOM.

De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Andrology*, v. 13, p. 368-386, 1995.

- De LAMIRANDE, E.; TSAI, C.; HARAKAT, A. et al. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *Journal of Andrology*, v. 19, p. 585–594, 1998.
- De LEEUW, F.E.; de LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v. 3, p. 32-44, 1993.
- DIPLOCK, A. Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 53, n. 1, p. 189-193, 1991.
- DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertility and Sterility*, v. 72, n. 3, p. 484-95, 1999.
- EL-ALAMY, M.A.; FOOTE, R.H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Animal Reproduction Science*, v. 65, p. 245-254, 2001.
- ESHRE, Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Human Reproduction*, v. 13, n. 1, p. 142-145, 1998.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceito, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, M.P.; FANHANI, A.P.G. Agentes antioxidantes: seu papel na nutrição e saúde dos atletas. *SaBios-Revista Saúde e Biologia*, v. 1, n. 2 p. 33-41, 2006.
- FLESCHE, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1469, p. 197-235, 2000.
- FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, v. 71, p. 13-23, 2002.
- GOMES, F.S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. *Revista de Nutrição*, v. 20, n. 5, p. 537-548, 2007.
- GREEN, S.; FISHEL, S. Morphology comparison of individually selected hyperactivated and non-hyperactivated human spermatozoa. *Human Reproduction*, v. 14, p. 123-130, 1999.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidante e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 28, n. 4, 2004.

- GUIMARÃES FILHO, C.; SOARES, J.G.G.; ARAÚJO, G.G.L. Sistemas de produção de carnes caprina e ovina no Semi-árido nordestino. In: I Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte. João Pessoa-PB, *Anais...* EMEPA-PB, João Pessoa-PB, p.21-34, 2000.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Claredon Press, 1989, 543 p.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 1-85, 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Antioxidant defenses. In: Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarenton Press, 1999. p.105-245.
- HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H. et al. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrosomereacted goat sperm. *Biomedical Research*, v. 16, n. 2, p. 119-123, 2005.
- HAUGLAND, R.P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. *Molecular Probes*, 7 ed., 2001.
- HELLSTROM, W.J.G.; BELL, M.; WANG, R. et al. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. *Fertility and Sterility*, v. 61, p. 1117-1122, 1994.
- HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology*, v. 26, p. 70-75, 1989.
- HOLMES, R.P.; GOODMAN, H.O.; SHIHABI, Z.K. et al. The taurine and hypotaurine content of human semen. *Journal of Andrology*, v. 13, p. 289-292, 1992.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Anuário Estatístico do Brasil*, 2008.
- IGBAL, N.; HUNTER, A.G. Effect of various capacitation systems on bovine sperm motion characteristics, acrosome integrity, and induction of hyperactivation. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 91-102, 1995.
- JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R.J. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, v. 31, p. 531-537, 1979
- JOSHI, N. Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by atomic force microscopy. *Fertility and Sterility*, v. 75, n. 5, p.961-66, 2001.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 113-141, 2000.

- LEHMANN, C.; WOLLENBERGER, U.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R. et al. Bioelectrocatalysis by a selenoenzyme. *Journal Electroanalytical Chemistry*, p. 259-263, 1998.
- LUCESOLI, F.; FRAGA, C. Evaluación del estrés oxidativo. *Antioxidante Calidad Vida*, v. 1, n. 4. p. 8-13, 1995.
- MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB Journal*, v.1, n. 6, p 441-445, 1987.
- MATES, J.M.; PEREZ-GOMEZ, C.; NUNEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, v. 32, p. 595-603, 1999.
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 55-65, 1996.
- MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction and Fertility*, v. 8, p. 1013-1020, 1996.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, 327-344, 2002.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. *Biochemical Journal*, v. 52, p. 711-760, 1983.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 247, p. 188-192, 1972.
- MOLINA, M.R. El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Química Viva*, v. 2, n. 1, 2003.
- MONTEIRO JR, P.L.J.; PEIXOTO, A.L. V.A.; SOUZA, A.F. et al. Adição de vitamina C e Trolox em amostras de sêmen de ovinos criopreservadas utilizando duas curvas de congelamento. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 3, Belém, 2006. *Anais...*, Belém, 2006. CDROOM.
- MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update*, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.
- MORTIMER, S.T. CASA- Practical aspects. *Journal of Andrology*, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.
- MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 11, p. 25-30, 1999.

NOILES, E.E.; BAILEY, J.L.; STOREY, B.T. Temperature dependence of the water permeability,  $L_p$ , of murine sperm shows a discontinuity between 4<sup>0</sup> and 0<sup>0</sup>C. *Cryobiology*, v. 32, p. 220-238, 1995.

NORBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thiredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reative oxygen species. *Human Reproduction*, v .5, p. 399-420, 1999.

PAPAS, A.M. Diet and oxidant status. *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, p. 999-1007, 1999.

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

PÉREZ, L.J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A. et al. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*, v. 46, p. 131-140, 1996.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

REGE, J.E.O.; TOE, F.; MUKASA-MUGERWA, E. et al. Reproductive characteristics of Ethiopian highland sheep II. Genetic parameters of semen characteristics and their relationships with testicular measurements in ram lambs. *Small Ruminant Research*, v. 37, p. 173-87, 2000.

RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S. et al. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, v. 70, p. 518-522, 2004.

ROCA, J.; GIL, M.A.; HERNANDEZ, M. et al. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology*, v. 25, n. 3, p. 397-405, 2004.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; EKWALL, H.; LINDE-FORSBERG, C. Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 47, p. 279/285, 1993.

ROVER JUNIOR, L.; HÖCEHR, N.F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, v. 24, n.1, 112-119, 2001.



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

SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.

SCHMEHL, M.K.; VAZQUEZ, I.A.; GRAHAM, E.F. The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, v. 23, p. 512-517, 1986.

SHANNON, P.; VISHWANATH, R. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Animal Reproduction Science*, v. 39, p. 1-10, 1995.

SHAMI, N. J.; MOREIRA, E, A. Licopeno como agente antioxidante. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 2, 2004.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Journal of Clinical Nutrition*, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SIKKA, S.C.; GREEN, A.G.; CHAUHAN, V. et al. Proteoliposomes interaction with human erythrocyte membranes-functional implantation of gamma glutamyl transpeptidase. *Biochemistry*, v. 21, p. 2356-2366, 1982.

SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA,.; CHIRINÉA, D.H ; LOPES, M.D. Descrição de danos ultraestruturais em espermatozoides caninos criopreservados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, Curitiba, PR. *Anais...*, Belo Horizonte, MG : CBRA, 2007. Disponível em [www.cbra.org.br/publicações.do](http://www.cbra.org.br/publicações.do).

SILVA, E.C.B.; SILVA, K.M.G.; MORAES, T.A.P. Eficiência de Trolox e Pentoxifilina na diluição, pós-congelação, de amostras de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 3, Belém, 2006. *Anais...*, Belém, 2006. CDROOM.

SIMPLÍCIO, A.A.; SANTOS, D.O. Estação de monta x mercado de cordeiro e leite (manejo reprodutivo). In: SIMPÓSIO DE CAPRINOS E OVINOS DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2005. *Anais...* Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2005.

- SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SING, B.K. et al. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science*, v. 41, p. 237-243, 1996.
- SLAWETA, R.; LASKOWSKA, T.; SZYMANSKA, E. Lipid peroxides, spermatozoa quality and activity of glutathione peroxidase in bull semen. *Acta Physiologica Polonica*, v. 39, n. 3, p. 207-214, 1988.
- SOARES, A.T.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, v. 3, n. 2, p. 53-63, 2009.
- STOREY, B.T.; NOILES, E.E.; THOMPSON, K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, v. 37, p. 46-58, 1998.
- SWENSON, M.J., REECE, W.O. DUKES *Fisiologia dos Animais Domésticos*. 11ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. S.A., 1996. 856 p.
- TAQUEDA, G.S.; BATISTA, A.M.; SOUZA, A.F. et al. Taxa de fertilidade de ovelhas Santa Inês inseminadas com sêmen criopreservado com vitamina C, utilizando duas curvas de congelamento. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 3, Belém, 2006. *Anais...*, Belém, 2006. CDROOM.
- TARDIF, A.L.; FARREL, P.B.; TROUERN-TREND, V. et al. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5 °C. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 1606-1612, 1996.
- TRALDI, A.S. Biotécnicas Aplicadas em Reprodução de Pequenos Ruminantes. In: FEIRA INTERNACIONAL DE CAPRINOS E OVINOS, 3, São Paulo. *Anais...* 2006.
- TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility: A clinical perspective. *Human Reproduction Update*, v. 14, p. 243-258, 2008.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E. et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, v. 48, p. 269-278, 1997.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.
- YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 349-355, 2000.

YU, P.B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.

YU, T.W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutation Research*, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.

ZINI, A; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology*, v. 16, n. 3, p. 183-188, 1993.

WANG, A.W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I. et al. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, v. 49, p. 921-925, 1997.

WARREN, J.S.; JOHNSON, K.J.; WARD, P.A. Oxygen radicals in cell injury and cell death. *Pathology and Immunopathology Research*, v. 6, p. 301-315, 1987.

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

## **4 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

#### **4.1 Análise estrutural e ultraestrutural de espermatozoides caprinos criopreservados em leite desnatado acrescido de glicerol, superóxido dismutase e catalase**

*Structural and ultrastructural analyses of goat spermatozoa frozen in skimmed-milk plus glycerol, superoxide dismutase and catalase*

Maria Shirlei Rodrigues de Moraes Barros<sup>1</sup>, Sildivane Valcácia Silva<sup>1</sup>,  
Adriana Trindade Soares<sup>1,2</sup>, Felipe Costa Almeida<sup>1</sup>, Christina Alves Peixoto<sup>3</sup>,  
Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – EMEPA/PB

<sup>3</sup>Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) – Recife – PE.

#### **RESUMO**

Objetivou-se com esse estudo avaliar a estrutura e ultraestrutura de espermatozoides caprinos, submetidos à criopreservação com diluente à base de leite desnatado e glicerol (7%), suplementado com superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), em diferentes concentrações. Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Boer, submetidos à colheita de sêmen com vagina artificial. As amostras de sêmen foram diluídas em leite desnatado acrescido de glicerol (7%), de forma a apresentar  $320 \times 10^6$  espermatozoides/mL, e suplementados com antioxidantes de acordo com os grupos experimentais: G1) diluente (Controle); G2) diluente + SOD 25 U/mL; G3) diluente + SOD 50 U/mL; G4) diluente + SOD 100 U/mL; G5) diluente + CAT 25 U/mL; G6) diluente + CAT 50 U/mL; G7) diluente + CAT 100 U/mL e G8) diluente + SOD 100 U/mL + CAT 25 U/mL. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em palhetas (0,25 mL), congeladas e armazenadas em botijão criobiológico (-196°C). Após descongelação (37 °C/30 segundos), alíquotas de sêmen de cada grupo foram avaliadas quanto a integridade da membrana plasmática (iMP), do acrossoma (iAc) e ultraestrutura (microscopia eletrônica de transmissão). Não foi constatada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais para iMP e iAc. Na avaliação ultraestrutural, espermatozoides *in natura* apresentaram-se morfologicamente preservados, principalmente na membrana mitocondrial. A análise das células pós-descongelação evidenciou maior quantidade de danos no acrossoma, todavia em menor percentual nas células do G8. O G7 apresentou dano ultraestrutural no acrossoma de 92,31% dos espermatozoides avaliados. Em contrapartida, grande porcentagem de espermatozoides apresentaram membrana plasmática e acrossomal intactas, principalmente nos grupos G2, G4, e G8. Com base nos resultados de ultraestrutura, é possível recomendar a adição de SOD (100U/mL) e CAT (25 U/mL) ao diluente de congelação do sêmen caprino à base de leite desnatado e glicerol.

**Palavras-chave:** fluorescência, membrana plasmática, ultraestrutura.

## ABSTRACT

*Aimed with this study to evaluate the structural and ultrastructural of goat spermatozoa frozen in skimmed-milk plus glycerol, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), in different concentrations. It was used five bucks of Boer race, submitted to semen collect by artificial vagina. Semen samples were diluted in skimmed-milk plus glycerol (7%), aiming have  $320 \times 10^6$  sperm/mL, supplemented with antioxidants according to the experimental groups: G1) extender (control), G2) extender SOD + 25 IU/mL; G3) extender + SOD 50 IU/mL; G4) extender + SOD 100 IU/mL; G5) extender + CAT 25 IU/mL; G6) extender + CAT 50 IU/mL; G7) extender + CAT 100 IU/mL and G8) extender + SOD 100 IU/mL + CAT 25 IU/mL. Samples were packed in straws (0.25 mL), frozen and stored in cold storage cylinder (-196 °C). After thawing (37 °C/30 seconds), aliquots of semen from each group were evaluated for plasma membrane (iMP) and acrosoma (iAc) integrity, and ultrastructure. There was no significant difference ( $P > 0.05$ ) among experimental groups for the parameters of iMP and iAc. In ultrastructural evaluation, fresh sperm was morphologically preserved mainly on mitochondrial membrane. Analyzes of thawed cells showed greater quantity of damages on acrosome; however, in lower percentage on G8 cells. G7 cells showed ultrastructural damages in acrosomes of 92.31% of spermatozoas. In contrast, great percentage of spermatozoa have plasma and acrosomal membranes intact, mainly on G2, G4 and G8 groups. Based on the ultrastructural results, it can be recommended addition of SOD (100 U/mL) and CAT (25 U/mL) on the freezing goat semen diluents with skimmed-milk and glycerol.*

**Keyword:** *fluorescence, plasma membrane, ultrastructure.*

## 1 INTRODUÇÃO

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

Espécies reativas de oxigênio (ROS) e antioxidantes são produtos do metabolismo celular normal. Apesar das ROS terem se mostrado necessárias para capacitação e hiperativação do espermatozoide, além da fusão espermatozoide-oócito, quantidades excessivas produzem impacto negativo na qualidade seminal. Para neutralizar a possibilidade de danos celulares causados pela produção excessiva de ROS, os antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) removem o excesso de ROS e permitem que se alcance o equilíbrio entre a produção benéfica de oxidante e o estresse oxidativo (AGARWAL et al., 2007).

O sêmen tem sido avaliado rotineiramente pela microscopia ótica. No entanto, nos últimos anos, com o avanço das biotecnologias, vários métodos foram desenvolvidos para

avaliar os espermatozoides, uma vez que análises isoladas não representam resultados reais da capacidade fertilizante deste gameta.

Para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que esteja morfológica e metabolicamente perfeito. A presença da membrana íntegra é pré-requisito para que ocorram os eventos relacionados ao processo da fertilização, como capacitação espermática, penetração através dos revestimentos do oócito, ligação à zona pelúcida, reação acrossômica e fusão com o oolema (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997).

As mitocôndrias, localizadas na peça intermediária do espermatozoide, são responsáveis pela fosforilação oxidativa e produção de ATP como fonte de energia metabólica para o batimento flagelar. Por outro lado, o acrossomo é indispensável para a fertilização (GADELLA, 2008).

Guerra et al. (2004) ressaltaram que células espermáticas danificadas produzem grandes quantidades de ROS, especialmente o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), os quais são altamente reativos e podem atacar principalmente a membrana plasmática. A SOD protege a célula das reações danosas do  $O_2^-$  e a CAT tem o mais alto número de turnover (kcat) conhecido em enzimas: uma molécula de CAT pode catalisar a decomposição de até 40.000.000 moléculas de  $H_2O_2$  por segundo (NELSON e COX, 2007), tornando-a importante para a desintoxicação desta substância. Entretanto, segundo Maxwell e Stojanov (1996), a necessidade da SOD nos sistemas biológicos poder ser quatro vezes maior do que a de CAT para atuar contra as ROS.

Dentre as técnicas de avaliação do sêmen, grande ênfase vem sendo dada ao uso de sondas fluorescentes, por marcar estruturas específicas das células e detectar a integridade estrutural ou funcional de forma objetiva (CELEGHINI et al., 2007). A ultraestrutura dos espermatozoides de vertebrados e invertebrados tem sido intensivamente estudada há muitos anos pela microscopia eletrônica de transmissão (JOSHI, 2001). Entretanto, dados referentes à ultraestrutura de espermatozoides caprinos são escassos.

Por conseguinte, o objetivo desse estudo foi avaliar a estrutura e a ultraestrutura de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação utilizando diluente à base de leite desnatado e glicerol (7%), suplementado com SOD e CAT, em diferentes concentrações.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes utilizados no experimento foram obtidos da Sigma Aldrich Co.<sup>®</sup> (St. Louis, MO, USA).

### 2.1 Animais e Local do Experimento

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Boer, com fertilidade anteriormente comprovada e idade variando de 24 a 36 meses. Os animais eram criados em sistema intensivo, alimentados com 400 gramas de concentrado comercial (45% milho, 35% farelo de soja e 20% farelo de trigo) e capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado, no cocho, além de sal mineral e água *ad libitum*. As colheitas de sêmen foram realizadas com vagina artificial e uma fêmea, em estro, como manequim. Foram obtidos quatro ejaculados de cada reprodutor, correspondendo a 20 amostras de sêmen.

Os animais pertenciam à Estação Experimental Benjamim Maranhão, da Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba, localizada no município de Campo de Santana, microrregião Agreste do Estado da Paraíba, com clima tropical semiárido e situada a 06°29'18" de latitude sul e 35°38'14" de longitude oeste, altitude de 168 metros e precipitação média anual de 431,8 mm<sup>3</sup> (BRASIL, 2005).

### 2.2 Análise e Criopreservação do Sêmen

Após colheita, as amostras de sêmen foram submetidas às avaliações de motilidade (0-100%) e vigor (0-5) espermático de cada ejaculado, utilizando microscópio de contraste de fase (Olympus, Tokyo, Japan) com objetiva de 40x, após prévia diluição (1:1; v:v) em solução de citrato de sódio a 2,94% (pH 7,4). Foram selecionados os ejaculados com motilidade  $\geq 70,0\%$  e vigor  $\geq 3$ .

A seguir, procedeu-se à formação do *pool*, o qual foi avaliado quanto a motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. A concentração espermática foi obtida em câmara de Neubauer, na diluição de 1:200, em formol salino. A morfologia espermática foi avaliada pelo método da câmara úmida (MIES FILHO, 1987), sendo aprovadas as amostras que apresentaram patologias espermáticas  $\leq 20\%$ .



O *pool* de ejaculados foi submetido a centrifugação (800 x g, 10 minutos) em Tris (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488 g de frutose; 100 mL de água ultrapura, pH 6,8), na proporção de 1:9 (v:v; sêmen:solução de lavagem), duas vezes, e diluído na concentração de  $320 \times 10^6$  espermatozoides/mL em diluente à base de leite desnatado [10g de leite desnatado em pó (Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil), 194 mg de glicose, 100 mL de água bidestilada, 7% de glicerol, 50 mg de estreptomicina e 100 UI de penicilina, de forma a obter a concentração final de  $320 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

As amostras de sêmen foram criopreservadas de acordo com o grupo experimental, conforme a adição de diferentes concentrações de antioxidantes: G1) sem antioxidante (Controle); G2) SOD 25 U/mL; G3) SOD 50 U/mL; G4) SOD 100 U/mL; G5) CAT 25 U/mL; G6) CAT 50 U/mL; G7) CAT 100 U/mL e G8) SOD 100 U/mL + CAT 25 U/mL.

Em seguida, as amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL) e submetidas à refrigeração e congelação em sistema automatizado (modelo TK 3000<sup>®</sup> - TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, Brasil), na curva de refrigeração de - 0,25 °C/minuto, iniciando a 27 °C até atingir 5 °C, e procedendo-se posteriormente a curva de congelação com redução da temperatura de -20 °C/minuto até atingir -120 °C. Após a congelação, as palhetas foram distribuídas em raques e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

### 2.3 Avaliação Espermática Pós-descongelação

Após a descongelação (37 °C/30 segundos), alíquotas de sêmen de cada grupo foram processadas e avaliadas quanto à iMP, iAc e ultraestrutura. Para análise da integridade da membrana plasmática, utilizou-se o método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e Iodeto de Propídio (IP), modificado por Coletto et al. (2002). Alíquotas de 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 ultrapura; 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. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com aumento de 400x, usando filtro de emissão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485/20 nm, e classificados como portadores de membrana intacta, quando se apresentavam corados em verde, e como portadores de membrana danificada, quando corados em vermelho.

Para análise da integridade do acrossoma, os espermatozoides foram corados com Isotiocianato de Fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA), de acordo com técnica descrita por Roth et al. (1998). Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os gametas foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentavam a região acrossomal corada em fluorescência verde, ou como portadores de acrossoma reagido, quando apresentavam uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda região da cabeça.

A identificação de danos na ultraestrutura espermática foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Amostras de sêmen *in natura* e criopreservadas foram lavadas três vezes (1200 x g; 5 minutos) em tampão cacodilato de sódio (0,1 M; pH 7,2), fixadas *overnight* em solução contendo glutaraldeído (2,5%), paraformaldeído (2,5%) e tampão cacodilato de sódio. Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas numa solução contendo Tetróxido de Ósmio (1%), CaCl<sub>2</sub> (2 mM) e Ferricianeto de Potássio (0,8%) em tampão cacodilato (0,1 M; pH 7,2). Novamente lavadas em tampão cacodilato e contrastadas em bloco com Acetato de Uranila (2,5%).

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

#### 2.4 Análise Estatística

Os dados obtidos das avaliações da integridade da membrana plasmática e do acrossoma foram avaliados por análise de variância (ANOVA), após transformação do arco seno ( $\arcsen \sqrt{P/100}$ ) dos valores percentuais e teste de comparação múltipla de Tukey, utilizando o programa INSTAT para Windows (versão 3.01), com nível de significância de  $P < 0,05$ . Utilizou-se a análise descritiva para avaliar a ultraestrutura dos espermatozoides.

### 3 RESULTADOS

A motilidade total das amostras de sêmen *in natura* foi de 80%. Na avaliação do sêmen pós-descongelamento (Tabela 1), não foi constatada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais, quanto aos resultados de integridade de membrana plasmática (iMP) e de acrossoma (iAc) dos espermatozoides descongelados de caprinos (Tabela 2).

Na análise ultraestrutural observou-se, nas amostras do sêmen *in natura*, maior preservação do acrossoma, quando comparado ao sêmen criopreservado (Tabela 2), (Figura 1A), e na peça intermediária constatou-se mitocôndrias e membranas plasmáticas bem preservadas (Figura 1B).

Após-descongelamento observou-se nas amostras de sêmen submetidas a congelamento utilizando diluente à base de leite desnatado e glicerol, sem antioxidante (grupo controle), grandes porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática intacta (Tabela 2) e pequena porcentagem destes gametas com membrana acrossomal externa íntegra. Os principais danos constatados na membrana acrossomal foram vesiculações (semelhante à reação acrossomal), perda do conteúdo acrossomal e edema de membrana plasmática (Figura 1C).

Nas amostras de sêmen suplementadas com SOD (25 e 50 U/mL) observou-se severa dissolução da cromatina dos espermatozoides. Nas amostras suplementadas com CAT 25U/mL constatou-se edema de membrana na peça intermediária, e naquelas com CAT 100U/mL, as mitocôndrias e axonemas apresentaram-se 100% íntegros (Tabela 3). As amostras congeladas com CAT 100 U/mL apresentaram danos severos na ultraestrutura dos acrossomas, como dissolução da cromatina e alterações na membrana nuclear dos espermatozoides avaliados.

O acrossoma foi a estrutura que apresentou mais danos no processo de criopreservação (Tabela 2). Nas amostras suplementadas com SOD 100 U/mL + CAT 25 U/mL constatou-se percentuais de espermatozoides com acrossoma íntegros próximos aos observados nas amostras de sêmen *in natura*. No entanto, o percentual de mitocôndrias intactas (Figuras 1E e 1F) neste grupo foi maior do que aquele observado com o sêmen *in natura* (Tabela 3). Ressalta-se, ainda, que nestas amostras em que se adicionou SOD + CAT foram observados maiores percentuais de espermatozoides com dissoluções da cromatina (Figura 1F) do que nas amostras do sêmen *in natura*.

Aparentemente a membrana plasmática, as mitocôndrias e o axonema foram as estruturas menos afetadas pela criopreservação (Tabela 3). Observou-se maior percentual de

espermatozoides com integridade da membrana plasmática da peça intermediária nas amostras de sêmen suplementadas com SOD 100 U/mL + CAT 25 U/mL (Tabela 3), que também apresentou alterações em menor proporção, na membrana acrossomal externa, quando comparada aos demais grupos experimentais (Tabela 2).

#### **4 DISCUSSÃO**

Neste estudo, realizou-se uma dupla centrifugação, para a remoção do plasma seminal, rico em antioxidantes endógenos. No entanto, logo após, foi adicionado leite desnatado e glicerol e antioxidantes exógenos, observando-se efeitos benéficos ao sêmen criopreservado. Os resultados satisfatórios (acima de 40,00%) observados nas células com membrana plasmática íntegras, pode ser consequência do tipo de crioprotetor (glicerol) e do método de congelamento utilizados, uma vez que o sistema automatizado possui maior controle da redução de temperatura (KUMAR et al., 2003), e também da adição de antioxidantes exógenos, pois segundo Armstrong et al. (1998), durante as manipulações espermáticas, em laboratório, especialmente na ausência do plasma seminal, antioxidantes celulares são importantes em preservar a motilidade e a habilidade dos espermatozoides sofrerem capacitação e reação do acrossoma. O processo de criopreservação do sêmen caprino, dependendo do diluidor utilizado, necessita da centrifugação para remover o plasma seminal, que contém enzimas responsáveis pela hidrólise de triglicerídeos presentes tanto na membrana plasmática quanto no diluente a base de leite, formando o ácido oléico, altamente tóxico para o espermatozoide (NUNES, 1982).

Apesar do glicerol induzir danos osmóticos aos espermatozoides, as lesões dependem da espécie estudada e, no caso do sêmen caprino, tem sido relatada tolerância a estas condições osmóticas, em virtude dos espermatozoides se adaptarem rapidamente a estas alterações (PURDY, 2006), provavelmente em decorrência da composição de sua membrana plasmática, rica em ácidos graxos saturados (RANA et al., 1991), que oferecem melhor estabilidade, em comparação a outras espécies, como humanos, suínos e equinos (LADHA, 1998).

A análise espermática utilizando as sondas fluorescentes evidenciou que, apesar de não apresentarem diferença estatística, a adição de SOD (50 e 100 U/mL) e CAT (50 e 100 U/mL) promoveu valores numericamente maiores de gametas com acrossomas íntegros. Estes resultados sugerem que a SOD exerceu proteção a célula contra as reações danosas do

$O_2^-$ , enquanto a CAT pode ter catalisado a decomposição de moléculas de  $H_2O_2$  (NELSON e COX, 2007), determinando a desintoxicação deste oxidante. Resultado satisfatório também foi observado nas amostras de sêmen suplementadas com SOD 100U/mL + CAT 25 U/mL, onde se constatou numericamente maior porcentual de células com acrossomas íntegros. O uso destas concentrações de antioxidantes teve como base o estudo de Maxwell e Stojanov (1996), ao observarem que a necessidade de SOD nos sistemas biológicos é quatro vezes maior do que a de catalase para atuar contra as ROS.

A análise ultraestrutural constatou que as amostras de sêmen caprino submetidas a congelamento apresentaram grande porcentual de espermatozoides com danos na membrana acrossomal externa, e que a adição de substâncias antioxidantes não preservou estas estruturas celulares, indicando ineficácia em contrapor ao efeito do estresse oxidativo ocasionado pela criopreservação (KHERADMAND et al., 2006). Todavia, a associação de SOD (100 U/mL) + CAT (25 U/mL) determinou menor porcentual de células com acrossomas danificados, ratificando a necessidade de associação destes antioxidantes, na concentração de quatro para um, respectivamente de SOD e CAT (MAXWELL e STOJANOV, 1996). Nas amostras de sêmen suplementadas com CAT 100 U/mL, os espermatozoides apresentaram lesão em 92,31% dos acrossomas, demonstrando que a maior concentração deste antioxidante pode não apresentar efeito antioxidante, determinando perda da capacidade de fertilização, uma vez que a membrana plasmática e, principalmente, o acrossoma precisam estar intactos para que haja a união dos gametas masculino e feminino (SOARES e GUERRA, 2009).

A rarefação, dissolução e vacúolos, encontrados no núcleo da cabeça dos espermatozoides de amostras de sêmen *in natura* e pós-descongelamento, são classificadas como danos na condensação da cromatina, típicos em espermatozoides de mamíferos (PESCH e BERGMANN, 2006). Ressalta-se, todavia, que a identificação destas lesões, somente foi possível devido à análise por MET para avaliação espermática, uma vez que na microscopia ótica estes danos são imperceptíveis (LANDIM-ALVARENGA e ALVARENGA, 1997).

Silva et al. (2009a) observaram que a criopreservação do sêmen canino induz a falsa reação acrossomal, provavelmente pelo aumento da fluidez da membrana plasmática ocasionada por alteração dos fosfolípidos como forma de estabilizar a membrana após a descongelamento, facilitando a perda do acrossoma. No entanto, a membrana plasmática localizada na região da cabeça é mais densa, por apresentar maior acúmulo de esteróides (LADHA, 1998). Por conseguinte, alterações na temperatura podem promover estresse nas membranas, facilitando o efluxo de colesterol, que desencadeia o processo de capacitação, o que explicaria a maior sensibilidade do sêmen caprino ao processo de criopreservação

(CASTELO et al., 2008), com perda do acrossoma na maioria das células, conforme foi observado neste estudo, em praticamente todos os tratamentos, com exceção do G8 (SOD 100U/mL + CAT 25U/mL), onde houve maior preservação dessa estrutura.

As mitocôndrias das amostras de sêmen criopreservados do G3, G7 e G8, apresentaram-se mais preservadas que o sêmen *in natura* e a membrana plasmática da peça intermediária, das amostras de sêmen do G8, apresentou maior preservação que todos os tratamentos, sugerindo que a adição dos antioxidantes são benéficas para a motilidade e viabilidade da célula espermática, ainda, que as mitocôndrias também apresentaram vacuolização, contribuindo para a redução da motilidade espermática (SILVA et al., 2009a).

As análises da ultraestrutura de espermatozoides *in natura*, pós-descongelção e após reação acrossomal observadas neste estudo, no grupo controle, ratificam os resultados de Silva et al. (2009a), utilizando espermatozoides de cães, e os de Hashida et al. (2005), com sêmen caprino, ao observarem que alterações nas mitocôndrias podem diminuir a motilidade e, conseqüentemente, a capacidade fertilizante dos espermatozoides.

Estes resultados podem evidenciar que a combinação de antioxidantes (SOD e CAT) conferiu melhor preservação da ultraestrutura espermática após a criopreservação, do que a adição de um único tipo de antioxidante, uma vez que apresentou maior número de células com acrossoma, membrana plasmática e mitocôndrias intactas. Em virtude de a SOD reduzir a ação das ROS e a CAT converter rapidamente o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (NELSON e COX, 2007), justifica os resultados da adição das duas substâncias antioxidantes atuando sinergicamente na prevenção da ação das ROS, produzidas em maior quantidade durante a criopreservação.

## 5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados da análise estrutural e ultraestrutural, é possível concluir que a associação de SOD (100U/mL) e CAT (25 U/mL) pode ser adicionada ao diluente à base de leite desnatado e glicerol, utilizado para congelação do sêmen caprino. Todavia, sugere-se a análise *in vivo* para comprovação da capacidade fertilizante dos espermatozoides.

## 6 AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa durante a realização do Doutorado do primeiro autor; à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro; à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA/PB), pela autorização do uso dos animais; e ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), pelas análises ultraestruturais em microscopia eletrônica de transmissão.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; PRABHAKARAN, S.A.; SIKKA, S.C. Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: Evidence-based analysis. *American Urology Association Update Series*, v. 26, p. 1–12, 2007.
- ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTRON, W.J. Antioxidant potential of human serum albumin: role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*, v.19, p. 412-419, 1998.
- BRASIL. *Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea do estado da Paraíba – Diagnóstico do Município de Campo de Santana*, 2005. 20 p.
- CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, n.2, p.93-99, 2008.
- CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.
- CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal*. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Edição, 1998. 49p.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P. de; ANDRADE, A.F.C. de; 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.
- 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.

- GADELLA, B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science*, v. 107, p. 229-236, 2008.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.E.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de literatura). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 28, p. 187-195, 2004.
- HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H.; MAT NOOR, M. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrosome-reacted goat sperm. *Biomedical Research*, v. 16, n. 2, p. 119-123, 2005.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 3-22, 2000.
- JOSHI, N. Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by atomic force microscopy. *Fertility and Sterility*, v. 75, n. 5, p. 961-66, 2001.
- KHERADMAND, A.; BABAEI, H.; ABSHNAS, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 7, n. 4, p. 40-45, 2006.
- KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, v. 46, p. 246-253, 2003.
- LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *The Journal of Membrane Biology*, v. 165, p. 1-10, 1998.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A. Microtubular defect in equine spermatozoa associated with infertility. *Equine Veterinary Journal*, v. 29, n. 6, p. 487-489, 1997.
- MARCHESI, D.E.; FENG, H.L. Sperm DNA integrity from sperm to egg. *Journal of Andrology*, v. 28, n. 4, p. 481-489, 2007.
- MAXWELL, W.M.C; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 8, p. 1013-1020, 1996.
- MIES FILHO, A. *Reprodução dos Animais*. 6. ed., Porto Alegre : Sulina. 1987. 314p.
- NELSON, D.L; COX, M.M. *Lehninger Princípios da Bioquímica*, 4ª Edição, São Paulo: Sarvier, 2007. 1232p.
- NUNES, J.F. *Etude des effets du plasma séminal sur la survie in vitro des spermatozoides de bouc*. 1982. 33f. Tese de Doutorado (Université Pierre et Marie Curie, Paris), 1982.



- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, v. 37, p. 597-612, 2006.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v. 63, p. 215-225, 2006.
- RANA, A.P.S.; MAJUMDER, G.C.; MISRA, S; GHOSH, A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1061, n. 2, p. 185-196, 1991.
- RODRIGUES-MARTINEZ, H.; ZHANG, B.R.; LARSSON, B. Bovine semen quality and the ability to produce embryos *in vivo* and *in vitro*. *Arquivo da Faculdade de Veterinaria da UFRGS*, v. 25, p. 108-126, 1997.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, J.L.; BUSH, L.M.; WILDT, D.E.; BUSH, M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 475-482, 1998.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From reseach bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.
- SARAIVA, K.L.A.; SILVA, A.K.S.E.; WANDERLEY, M.I.; ARAÚJO, A.A.A.; SOUZA, J.R.B.; PEIXOTO, C.A. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 90, p. 454-462, 2009.
- SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHINIRÉA, V.H.; LOPES, M.D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 2, p. 595-601, 2009a.
- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; ALMEIDA, F.C.; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. Criopreservação de sêmen ovino em diferentes estações climáticas: interferência da sazonalidade. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 4, 2009, João Pessoa-PB. *Anais...* João Pessoa-PB, 2009b. (CD-ROM).
- SOARES, A.T.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, v. 3, n. 2, p. 53-63, 2009.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60/61, p. 481-492, 2000.
- ZINI, A.; LIBMAN, J. Sperm DNA damage: Clinical significance in the era of assisted reproduction. *Canadian Medical Association Journal*, v. 175, n. 5, p. 494-500, 2006.

Tabela 1 – Médias ( $\pm$  erro padrão) dos percentuais de espermatozoides com membranas plasmáticas íntegras (iMP) e acrossomas íntegros (iAc) no sêmen caprino criopreservado em diluente à base de leite desnatado e glicerol, suplementado com superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), em diferentes concentrações

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>iMP %</b>	<b>iAc %</b>
Controle	55,50 $\pm$ 8,94	22,38 $\pm$ 5,17
SOD 25 U/mL	44,38 $\pm$ 9,33	29,00 $\pm$ 5,06
SOD 50 U/mL	52,88 $\pm$ 5,94	46,50 $\pm$ 9,94
SOD 100 U/mL	43,13 $\pm$ 6,74	32,25 $\pm$ 3,99
CAT 25 U/mL	59,88 $\pm$ 2,82	26,25 $\pm$ 3,31
CAT 50 U/mL	58,13 $\pm$ 10,38	39,50 $\pm$ 14,78
CAT 100 U/mL	49,50 $\pm$ 10,82	42,38 $\pm$ 7,53
SOD 100 U/mL+ CAT 25 U/mL	44,13 $\pm$ 14,23	41,38 $\pm$ 2,72

Tabela 2 – Porcentual de estruturas íntegras (membrana plasmática e acrossoma, e núcleo), da cabeça de espermatozoides caprino, obtidos de amostras de sêmen *in natura* e criopreservadas em leite desnatado e glicerol, suplementado com Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT), em diferentes concentrações, avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Grupos Experimentais	Membrana plasmática	Acrossoma	Núcleo
	%	%	%
<i>In natura</i>	44,26	42,62	77,05
Controle	54,54	18,18	96,97
SOD 25 U/mL	62,12	30,30	3,33
SOD 50 U/mL	51,11	13,33	66,66
SOD 100 U/mL	66,67	33,33	38,88
CAT 25 U/mL	48,00	28,00	62,00
CAT 50 U/mL	56,76	35,14	94,59
CAT 100 U/mL	63,07	7,69	80,00
SOD 100 U/mL+ CAT 25 U/mL	53,44	39,65	56,89

Tabela 3 – Porcentual de estruturas íntegras (membrana plasmática, mitocôndria e axonema), da peça intermediária, de espermatozoides caprinos obtidos de amostras de sêmen *in natura* e criopreservadas em leite desnatado e glicerol, suplementado com superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), em diferentes concentrações e avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Membrana plasmática %</b>	<b>Mitocôndria %</b>	<b>Axonema %</b>
<i>In natura</i>	42,22	80,00	88,88
Controle	54,90	68,62	96,08
SOD 25 U/mL	37,93	68,96	93,10
SOD 50 U/mL	43,24	81,08	87,84
SOD 100 U/mL	68,88	77,78	95,55
CAT 25 U/mL	38,71	75,80	88,71
CAT 50 U/mL	48,39	74,20	90,32
CAT 100 U/mL	52,38	100,00	100,00
SOD 100 U/mL+ CAT 25 U/mL	80,39	92,15	96,07

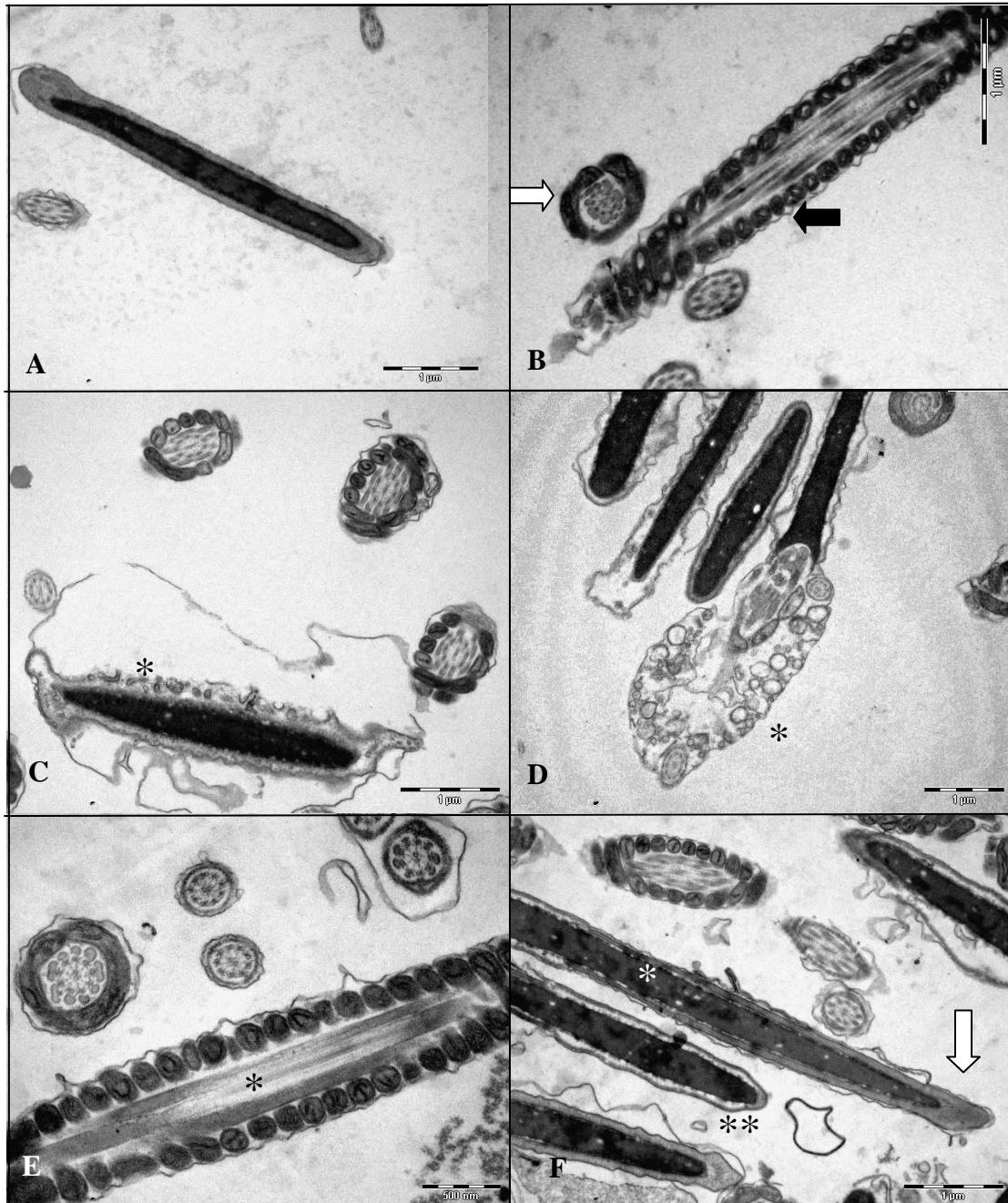


Figura 1- Ultraestrutura de espermatozoides obtidos de amostras de sêmen de reprodutores caprinos. A = Corte longitudinal da cabeça, com acrossoma intacto, obtido de amostra de sêmen *in natura*; B = corte longitudinal e transversal da peça intermediária, com as mitocôndrias (seta branca) e membrana plasmática preservadas (seta preta) obtidas de amostra de sêmen *in natura*; C = Corte longitudinal da cabeça espermática, com vesiculação (\*) semelhante a reação acrossomal, e cortes transversais da peça intermediária de espermatozoides pós-descongelção obtidos de amostras de sêmen do grupo controle; D = Desorganização da bainha mitocondrial (\*) de espermatozoides pós-descongelção, obtidos de amostras de sêmen do grupo controle; E = Corte longitudinal (\*) e transversal da peça intermediária de espermatozoides criopreservados em SOD 100 U/mL + CAT 25 U/mL, apresentando as mitocôndrias preservadas; F = Corte longitudinal da cabeças de espermatozoides criopreservados em SOD 100 U/mL + CAT 25 U/mL, com acrossoma preservado (seta branca) e reagido (\*\*). Núcleo apresentando rarefação da cromatina (\*).

## 4.2 Potencial de membrana mitocondrial e cinética de espermatozoides caprinos criopreservados em leite desnatado acrescido de glicerol, superóxido dismutase e catalase

*Mitochondrial membrane potential and kinetic of goat semen cryopreserved in Skimm-milk plus glycerol, superoxide dismutase and catalase*

Maria Shírlei Rodrigues de Moraes Barros<sup>1</sup>; Adriana Trindade Soares<sup>1,2</sup>;  
Sildivane Valcácia Silva<sup>1</sup>; Felipe Costa Almeida<sup>1</sup>; José Ferreira Nunes<sup>3</sup>,  
Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba, João Pessoa-PB.

<sup>3</sup>Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE.

Autor para correspondência: mpguerra@dmv.ufrpe.br

### RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial da membrana mitocondrial (PMM) e a cinética de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação em leite desnatado e glicerol (7%), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Boer, submetidos à colheita de sêmen com vagina artificial. As amostras de sêmen foram diluídas em leite desnatado acrescido de glicerol (7%), de forma a apresentar  $320 \times 10^6$  espermatozoides/mL, e suplementados com antioxidantes de acordo com os grupos experimentais: G1) diluente (Controle); G2) diluente + SOD 25 U/mL; G3) diluente + SOD 50 U/mL; G4) diluente + SOD 100 U/mL; G5) diluente + CAT 25 U/mL; G6) diluente + CAT 50 U/mL; G7) diluente + CAT 100 U/mL e G8) diluente + SOD 100 U/mL + CAT 25 U/mL. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em palhetas (0,25 mL), congeladas e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C). Após descongelação (37 °C/30 segundos), alíquotas de sêmen criopreservado de cada grupo foram avaliadas quanto a PMM e cinética espermática (CASA), onde não se constatou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais em todos os parâmetros avaliados. Os resultados desse estudo sugerem que CAT e SOD, nas concentrações de 25 e 50U/mL, não devem ser adicionadas ao diluente de congelamento de sêmen caprino à base de leite desnatado e glicerol (7%); assim como outros estudos devem ser realizados utilizando concentrações maiores do que 100U/mL de SOD neste diluidor de congelamento de sêmen caprino, associado à avaliação *in vivo* da ação deste antioxidante.

**Palavras-chave:** Análise computadorizada, sêmen, ROS, catalase, superóxido dismutase.

## ABSTRACT

*With the objective of to evaluate mitochondrial membrane potential (MMP) and kinetic of goat sperm submitted to freezing in skimm-milk and glycerol (7%), superoxide dismutase and catalase. It was used five bucks of Boer race, submitted to semen collect by artificial vagina. Semen samples were diluted in skimm-milk plus glycerol (7%), aiming have  $320 \times 10^6$  sperm/mL, supplemented with antioxidants according to the experimental groups: G1) extender (control), G2) extender SOD + 25 IU/mL; G3) extender + SOD 50 IU/mL; G4) extender + SOD 100 IU/mL; G5) extender + CAT 25 IU/mL; G6) extender + CAT 50 IU/mL; G7) extender + CAT 100 IU/mL and G8) extender + SOD 100 IU/mL + CAT 25 IU/mL. Then the samples were packed in straws (0.25 mL), frozen and stored in cold storage cylinder (-196 °C). After thawing (37 °C/30 seconds), aliquots of semen frozen/thawed of each group were evaluated to PMM and kinetic (CASA), where did not observe significant difference ( $P > 0.05$ ) among experimental groups in all evaluated parameters. The results suggest that CAT and SOD, on the 25 and 50U/mL concentrations, should not be added on in skimm-milk diluent added with glycerol (7%) to freezing goat semen; as well as other studies should be realized using higher concentrations than 100U/mL of SOD in this diluent to freezing goat semen, associated to in vivo evaluation of these antioxidant action.*

**Keywords:** *Computadorized analysis, semen, ROS, catalase, superoxide dismutase.*

## 1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura representa uma importante atividade sócio-econômica para a população da região semi-árida do Nordeste brasileiro, onde os períodos críticos de seca interferem na produção de alimentos. Apesar de estes animais serem considerados de fácil adaptação, a associação entre vários fatores climáticos como temperatura, umidade e irradiação solar provocam alterações fisiológicas que interferem na sua produtividade (SILVA et al., 2005).

Desta forma, a demanda crescente por produtos de origem caprina induz a necessidade de melhorar a eficiência reprodutiva e produtiva desses pequenos ruminantes (SIMPLÍCIO e SANTOS, 2005; CARNEIRO, 2007). Nesse contexto, a intensificação do manejo reprodutivo e o melhoramento genético constituem etapas fundamentais para a expansão desta criação de forma competitiva, sendo os programas de reprodução assistida e o uso de biotecnologias, ferramentas otimizadoras deste processo (BICUDO et al., 2003).

A criopreservação dos espermatozoides determina redução de sua capacidade fertilizante, quando comparada àquela obtida após utilização do sêmen *in natura*, que pode ser explicada pela perda da viabilidade espermática, em decorrência da redução de sua capacidade funcional (SALAMON e MAXWELL, 1995). Durante as fases de congelação e

descongelamento, ocorre variação do volume celular, o que contribui para o aparecimento de danos espermáticos (BECKER-SILVA, 2004).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são fundamentais em processos fisiológicos como hiperativação da motilidade, capacitação, reação acrossomal e fertilização, como também podem causar severos danos aos espermatozoides, quando seus mecanismos de defesa estão limitados (GUERRA et al., 2004). A célula espermática dos mamíferos é altamente susceptível aos danos causados pelas ROS, devido à elevada quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e às baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu citoplasma reduzido (AITKEN, 1995).

As ROS podem ser produzidas no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (YU e ANDERSON, 1997), sendo que a sua principal fonte produtora é a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons (MOLINA, 2003). A superóxido dismutase (SOD) foi uma das primeiras enzimas metabolizantes de ROS a ser descoberta (ALVAREZ et al., 1987) e, segundo Ferreira e Matsubara (1997), possui a função de remover o radical superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio; enquanto a catalase (CAT) destrói o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e oxigênio.

Através da imagem digitalizada de cada célula, o sistema computadorizado de análise espermática (CASA) avalia, por processos analíticos, as propriedades de locomoção dos espermatozoides (BOYER et al, 1989; IGBAL e HUNTER, 1995; ESHRE, 1998). O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de membrana mitocondrial e a cinética de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação, em diluente à base de leite desnatado acrescido de glicerol (7%), SOD e CAT.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Os reagentes utilizados no experimento foram obtidos da Sigma Aldrich Co.<sup>®</sup> (St. Louis, MO, USA).



### 2.1 Local do Experimento

O experimento foi realizado na Estação Experimental Benjamim Maranhão, pertencente à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba, localizada no Município de Campo de Santana, microrregião Agreste do Estado da Paraíba, situada a 06°29'18" de latitude sul e 35°38'14" de longitude oeste, de clima tropical semiárido, com altitude de 168 metros, precipitação média anual de 431,8 mm<sup>3</sup> e temperatura média anual de 26 °C (BRASIL, 2005). As amostras de sêmen foram colhidas no mês de junho de 2009, quando o índice pluviométrico médio foi de 159,4 mm<sup>3</sup>.

### 2.2 Animais

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Boer, com idade variando entre 24 a 36 meses e com fertilidade comprovada. Uma fêmea em estro foi utilizada como manequim durante as colheitas de sêmen. Os caprinos eram criados em sistema intensivo, alimentados diariamente com 400 gramas de concentrado comercial (45% milho, 35% farelo de soja e 20% farelo de trigo) e capim elefante (*Pennisetum purpureum*), picado no cocho, além de sal mineral e água *ad libitum*. Foram obtidos quatro ejaculados de cada reprodutor, correspondendo a 20 amostras de sêmen.

### 2.3 Colheita e Avaliação do Sêmen

Para a colheita do sêmen utilizou-se o método da vagina artificial. Inicialmente os ejaculados foram submetidos às avaliações de motilidade (0-100%) e vigor espermático (0-5), utilizando microscópio de contraste de fase (Olympus, Tokyo, Japan) com objetiva de 40X, após prévia diluição (1:1; v:v) em solução de citrato de sódio a 2,94% (pH 7,4). Foram selecionados os ejaculados com motilidade  $\geq 70,0\%$  e vigor  $\geq 3$ .

### 2.4 Processamento do Sêmen

As amostras de sêmen aprovadas de cada repetição foram homogeneizadas e, em seguida, procedeu-se à formação do *pool* dos ejaculados dos cinco reprodutores. A seguir, uma alíquota de 10  $\mu$ L foi removida do *pool* e diluída em 2,0 mL de formol-salino para

realização da concentração espermática (1:200), utilizando a câmara de Neubauer. A morfologia espermática foi avaliada pela técnica de câmara úmida (MIES FILHO, 1987).

Após análise, o *pool* de ejaculados foi submetido a lavagem em solução de Tris (3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose; 100 mL de água bidestilada, pH 6,8), na proporção de 1:9 (v:v; sêmen:solução de lavagem), e centrifugação (800 x g, por 10 minutos), em duas repetições. Após remoção do sobrenadante, procedeu-se à diluição do *pellet* espermático em diluidor à base de leite desnatado [10 g de leite desnatado em pó (Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil), 194 mg de glicose, 100 mL de água bidestilada, 7% de glicerol, 50 mg de estreptomicina e 100 UI de penicilina], de forma a obter a concentração final de  $320 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

As amostras de sêmen foram criopreservadas de acordo com o grupo experimental, conforme a adição de diferentes concentrações de antioxidantes ao diluente: G1 = sem antioxidante (controle); G2 = 25U/mL de SOD; G3 = 50U/mL de SOD; G4 = 100U/mL de SOD; G5 = 25U/mL de CAT; G6 = 50U/mL de CAT; G7 = 100U/mL de CAT; G8 = 100U/mL de SOD + 25U/mL de CAT. Quatro repetições foram realizadas para cada grupo experimental.

## 2.5 Congelação do Sêmen

Após homogeneização, as amostras de sêmen diluídas foram envasadas em palhetas (0,25 mL), as quais foram lacradas com álcool polivinílico. Para o processo de criopreservação, utilizou-se o sistema de congelação automatizado (TK-3000<sup>®</sup>, TK Tecnologia em Congelação Ltda., MG, Uberaba, Brasil), utilizando a curva de congelação rápida (-0,25 °C/min, de 25 °C a 5 °C, e a -20 °C/min, de 5 °C a -120 °C), e, após atingir a temperatura de -120 °C, as palhetas foram distribuídas em raques e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

## 2.6 Avaliação do Sêmen Pós-descongelação

Após descongelação a 37 °C, durante 30 segundos, alíquotas de sêmen de cada grupo experimental foram submetidas a análise de potencial da membrana mitocondrial e cinética espermática. A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE e WELCH, 2006). Alíquotas de 50 µL de sêmen foram diluídas em 150 µL de Tris contendo 5 µL de JC-1 (0,15 mM em DMSO), incubadas por 10

minutos a 38 °C e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com aumento de 1000x sob óleo de imersão, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. As células com 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.

A cinética espermática foi avaliada utilizando o sistema de análise computadorizada (CASA - Sperm Class Analyzer SCA<sup>TM</sup> 2005, Microptics, S.L. Version 3.2.0 Barcelona, Spain), onde uma alíquota (10 µL) de sêmen foi colocada na Câmara de Mackler (37 °C) e avaliada em microscópio de contraste de fase (Nikon <sup>TM</sup> H5505 Eclipse 50i, Tokyo, Japan) e vídeo-câmera (Basler Vision Technologie <sup>TM</sup> A312FC, Ahrensburg, German). Foram avaliados os parâmetros de: Motilidade Total (MT;%), Progressiva (MP;%), Linearidade (LIN;%), Índice de Oscilação (WOB;%), Retilinearidade (STR;%), Padrão Médio da Velocidade Espermática (VAP;µm/s), Velocidade de Deslocamento Curvilíneo (VCL;µm/s), Velocidade de Deslocamento em Linha Reta (VSL;µm/s), Amplitude de Deslocamento Lateral de Cabeça (ALH;µm) e Frequência de Batimento Flagelar Cruzado (BCF;Hz).

O cálculo do *Dancemean* (DNCmean), parâmetro indicativo de hipermotilidade espermática, foi realizado utilizando-se a fórmula  $VCL/VSL \times ALH$  (MORTIMER e MAXWELL, 2004).

## 2.7 Análise Estatística

As diferenças entre os tratamentos foram analisadas pelo teste de análise de variância (ANOVA), após transformação em arco seno (arco seno  $\sqrt{P/100}$ ) dos valores percentuais, e teste de comparação múltipla de Tukey para as diferenças, utilizando o programa INSTAT para Windows (versão 3.01), com nível de significância de  $P < 0,05$ .

## 3 RESULTADOS

A motilidade total das amostras de sêmen *in natura* foi de 80%. Os resultados de potencial de membrana mitocondrial e cinética espermática do sêmen criopreservado de caprinos encontram-se na Tabela 1, onde se constata que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais em todos os parâmetros avaliados. No entanto, ressalta-se que a suplementação com 100U/mL de CAT (G7) ao diluente à base de leite

desnatado acrescido de glicerol (7%) proporcionou porcentual de espermatozoides com alto PMM numericamente maior do que o do grupo controle (G1). Por outro lado, a adição de SOD nas concentrações de 50 U/mL (G3) proporcionou valores numericamente maiores de MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, BCF e WOB do que nas amostras do grupo controle (G1). Enquanto os resultados obtidos das amostras de sêmen suplementadas com 100 U/mL de SOD (G4) foram numericamente maiores em MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN e WOB, do que no G1.

A adição de antioxidantes não interferiu ( $P > 0,05$ ) nos resultados de DNCmean, fator relacionado à hipermotilidade espermática (dados não mostrados), cuja média geral foi de 7,55  $\mu\text{m}$ , com variação de 6,49 a 8,32  $\mu\text{m}$ .

#### 4 DISCUSSÃO

Neste estudo, apesar da colheita de sêmen ter sido realizada na época chuvosa (precipitação de 159,4  $\text{mm}^3$ ), conforme recomendação de Silva (dados não publicados), a MT das amostras de sêmen *in natura* foi de 80%, valor inferior àquele observado por Cavalcante (2003), utilizando caprinos da raça Bôer em zonas com latitude acima de 40°. Esta diferença pode ser justificada pelo fato de que vários fatores climáticos, como temperatura, umidade e irradiação solar podem reduzir os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos criados na região do semi-árido paraibano (SILVA et al., 2005).

Neste estudo, o potencial da membrana mitocondrial dos espermatozoides também variou de acordo com o tipo e a concentração do antioxidante utilizado, uma vez que nas amostras de sêmen suplementadas com CAT constatou-se que o porcentual de células com alto PMM foi maior à medida que a concentração deste antioxidante aumentou. Além disso, o valor numericamente maior de espermatozoides com alto PMM foi observado nas amostras suplementadas com 100 U/mL de CAT (G7), do que nos demais grupos experimentais, o que pode ser explicado pelo fato desta enzima captar o peróxido de hidrogênio, decompondo-o em oxigênio e água antes que ele possa formar radicais hidroxilas. O oxigênio e a água produzidos nesse processo são reutilizados pelas células, como parte do metabolismo normal (FERREIRA e FANHANI, 2006).

Ressalta-se, todavia, que o PMM pode interferir em outras características espermáticas relacionadas à capacidade fertilizante do espermatozóide (CÂMARA e GUERRA, 2008), conforme foi observado neste estudo, onde se constatou que a suplementação com CAT (25, 50 e 100 U/mL) determinou redução do PMM e da motilidade espermática, corroborando com

os relatos de Marchesi e Feng (2007), em virtude de este parâmetro espermático ser dependente da atividade mitocondrial e de sua produção energética (ZINI e LIBMAN, 2006), o que torna indispensável a preservação da integridade estrutural e funcional desta organela.

Segundo o CBRA (1998), para aprovação do sêmen caprino descongelado, recomenda-se o valor mínimo de 30,00% de motilidade espermática total. Desta forma, com exceção das amostras de sêmen suplementadas com CAT 50 (G6) e 100 (G7) U/mL, avaliadas pelo sistema CASA, os valores de MT observados estão dentro dos parâmetros de normalidade para uso do sêmen descongelado na inseminação artificial.

A redução da motilidade espermática, após descongelação, observada neste estudo está de acordo com os relatos de Watson (2000), ao constatar que aproximadamente 40 a 50% da população total de células espermáticas não sobrevivem à criopreservação, mesmo em condições ideais de congelamento. Cavalcante (2003), avaliando o sêmen *in natura* e pós-descongelação de reprodutores caprinos da raça Boer pelo sistema CASA, constatou motilidade total e progressiva de 93,00% e 64,00% no sêmen *in natura*, e 51,00% e 21,00% pós-descongelação, resultando em perda de 42,00% e 43,00%, respectivamente. A redução da motilidade espermática, pós-descongelação, confirma o fato de que o processo de criopreservação do sêmen tem efeito deletério sobre este parâmetro celular (SUNDAMARAN e EDWIN, 2006). Todavia, os percentuais de MT e MP observados neste estudo, avaliados pelo CASA, foram inferiores aos relatados por Cavalcante (2003). As divergências nos resultados observados em reprodutores da mesma espécie, certamente se devem à composição do diluidor (TARDIF et al., 1997; SUAREZ e HO, 2003), ou à variação individual dos animais (WATSON, 2000).

A análise de MT observada pelo sistema CASA, apesar de não apresentar diferença estatística, evidenciou valores numericamente maiores nas amostras espermáticas suplementadas com 50 (G3) e 100 (G4) U/mL de SOD. Este resultado pode estar relacionado à preservação do equilíbrio entre a geração e a inativação de ROS, conservando a atividade metabólica das células espermáticas (De LAMIRANDE e GAGNON, 1995). Em contrapartida, as amostras suplementadas com CAT (G5, G6 e G7), assim como a associação de SOD + CAT (G8), determinaram valores menores de MT, demonstrando que a maior concentração deste antioxidante reduziu a qualidade espermática pós-descongelação (GUERRA et al., 2004).

Neste estudo, a constatação de valores numericamente maiores nas amostras de sêmen suplementadas com 50 (G3) e 100 U/mL (G4) de SOD em alguns parâmetros da cinética espermática (MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, BCF e WOB), em relação ao grupo controle

(G1), leva à suposição do efeito benéfico da ação deste antioxidante na remoção do radical superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Desta forma, apesar de não ter sido constatada diferença estatística entre os grupos experimentais, é possível supor que maiores concentrações de SOD podem resultar em diferença significativa, em relação às amostras do grupo controle, e melhorar a viabilidade dos espermatozoides, uma vez que, de acordo com Arruda (2000), quanto maior os valores observados nos parâmetros de MP, VAP, VSL, VCL, BCF, STR e LIN de espermatozoides equinos, melhor a sua qualidade espermática. Além disso, esta suposição também está fundamentada no fato de que, em menor concentração, a SOD é responsável pela redução da viabilidade e dos movimentos espermáticos (RAJASEKARAN et al., 1994), enquanto que, em elevadas concentrações, evita a redução da motilidade de espermatozoides de ratos (NONOGAKI et al., 1992).

Outro aspecto a ser considerado é que o valor de ALH encontrado na amostra do G4 (100U/mL de SOD) foi numericamente menor do que aquele do G1 (grupo controle;  $P > 0,05$ ) e, segundo Arruda (2000), quanto menor o valor deste parâmetro, melhor será a qualidade espermática.

O BCF indica a frequência de batimentos da cauda, e seu aumento, associado à diminuição do ALH, estão relacionados com a melhor capacidade dos espermatozoides penetrarem no muco cervical (MORTIMER, 2000). Neste estudo, foram observados valores numericamente maiores de BCF e menores de ALH nas amostras de sêmen suplementadas com 50 e 100 U/mL de SOD (G3 e G4, respectivamente), possibilitando a suposição de, ao se aumentar a concentração desta substância antioxidante, possibilitar a melhoria da qualidade espermática das amostras de sêmen.

A trajetória dos espermatozoides caprinos foi avaliada por Cox et al. (2006), onde caracterizaram estes gametas como relativamente rápidos, quando os parâmetros de VCL, VSL e VAP foram superiores a 100  $\mu\text{m/s}$ ; com movimentos lineares quando a LIN foi superior a 50% e ALH igual a 4,8  $\mu\text{m}$ , e constataram correlação entre os parâmetros de velocidade com a eficiência na migração no muco cervical caprino. No entanto, nas amostras descongeladas de sêmen caprino deste estudo, foram observados valores menores do que os estabelecidos por estes autores, em todos os grupos experimentais, evidenciando que os gametas não se apresentavam rápidos, com movimentos lineares.

Os valores do ALH observados nas amostras suplementadas com SOD (G3 e G4) e CAT (G5, G6 e G7), assim como sua associação (G8), foram numericamente menores do que aquele do grupo controle (G1). Estes resultados evidenciam redução do gasto de ATP,

visando manter sua reserva energética e proporcionar maior tempo de vida útil a este gameta no organismo da fêmea (ARRUDA, 2000). O que pode justificar os resultados observados de menor valor de ALH e maior de gametas com alto PMM nas amostras do G7 (100U/mL de CAT).

A análise do DNCmean, utilizada como indicador cinético de hiperativação espermática, não constatou diferença entre tratamentos. Todavia, uma vez que para o cálculo deste parâmetro são utilizados VCL, VSL e ALH, e que, segundo Arruda (2000), quanto maior VCL e VSL, e menor ALH, melhor a qualidade das amostras de sêmen, reforçam a suposição de que a adição de SOD nas concentrações de 50 e 100U/mL, apesar de não diferirem estatisticamente das amostras do grupo controle, melhoraram a qualidade espermática.

Ceroline et al. (2000) relataram que ejaculados de reprodutores suínos com índices elevados de viabilidade espermática, tanto antes quanto após a congelação, possuíam grandes concentrações de enzimas, como SOD e glutathione peroxidase selênio dependente (GSP-GSP-Pe-Se). Além de não existir estudos referentes à concentração destas substâncias antioxidantes nas amostras de sêmen de caprinos, assim como na sua adição aos diluidores de congelação de sêmen desta espécie, uma vez que geralmente são realizadas centrifugações para retirada do plasma seminal antes da adição do diluente, não há consenso quanto ao efeito preventivo da adição destas substâncias contra os danos oxidativos causados pelas ROS aos espermatozóides caprinos.

Nas amostras do grupo G8, onde se promoveu a associação das enzimas de SOD e CAT, acreditava-se que estas enzimas atuariam de maneira sinérgica, em virtude da SOD remover o radical superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio, e a catalase (CAT) destruir o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e oxigênio (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). No entanto, foi observado pequeno percentual de espermatozóides com alto PMM e com MT, demonstrando pequena reserva energética e menor tempo de vida útil deste gameta no organismo da fêmea, conforme foi relatado por Arruda (2000).

Uma vez que o sistema computadorizado avalia a cinética espermática, com o objetivo de determinar as trajetórias individuais dos espermatozoides (GIL et al., 2000; BAG et al., 2004), possibilitando pressupor a condição fisiológica de cada célula no sistema genital feminino (DAVIS e SIEMERS, 1995; VERSTEGEN et al., 2002), este estudo realizado nas amostras criopreservadas de sêmen caprino utilizando diluente à base de leite desnatado acrescido de glicerol (7%), SOD e CAT, pode indicar influência benéfica da adição do SOD (100U/mL) na célula espermática, apesar de não ter sido evidenciada diferença estatística,

bem como inferir a necessidade de outros estudos utilizando concentrações mais elevadas dessas substâncias no leite desnatado usado como diluidor de congelação do sêmen caprino.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo sugerem que CAT e SOD, nas concentrações de 25 e 50U/mL, não devem ser adicionadas ao diluente de congelação de sêmen caprino à base de leite desnatado e glicerol (7%); assim como outros estudos devem ser realizados utilizando concentrações maiores do que 100U/mL de SOD neste diluidor de congelação de sêmen caprino, associado à avaliação *in vivo* da ação deste antioxidante.

## 6 AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de Doutorado ao primeiro autor; à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro; à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA/PB), pela disponibilização dos animais; e à Universidade Estadual do Ceará (UECE), pela autorização para uso do sistema computadorizado de análise espermática (CASA).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 659-668, 1995.

ALVAREZ, J.G.; TOUCHSTONE, J.C.; BLASCO, L.; STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*, v. 8, p. 338-348, 1987.

ARRUDA, R.P. *Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)*. 2000. 121p. Tese de Livre Docência (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo).



- BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S.M.K.; MITTAL, J.P. Effect of post-thaw incubation in sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. *Theriogenology*, v. 62, p. 415-424, 2004.
- BECKER-SILVA, S.C. *Limites de tolerância do espermatozoide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluentes contendo sacarose ou trealose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes*. 2004. 121p. Tese de Doutorado, (Universidade de São Paulo, São Paulo).
- BICUDO, S.D.; SOUZA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégia de intensificação do manejo reprodutivo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.2, p.120-127, 2003.
- BOYER, S.P.; DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics and Gynecology*, v. 12, p. 167- 200, 1989.
- BRASIL. *Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea do estado da Paraíba – Diagnóstico do Município de Campo de Santana*, 2005. 20p.
- CARNEIRO, G.F. Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: Perspectivas atuais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v. 31, p. 268-273, 2007.
- CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, n.2, p.93-99, 2008.
- CAVALCANTE, T.V. *Concentrações plasmáticas de testosterona e fertilidade de machos caprinos da raça Bôer e Alpina durante as estações reprodutivas e não reprodutivas*. 2003. 77p. Tese de Doutorado (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal).
- CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal*. 2ª Edição. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1998. 49 p.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; BOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, v. 58, p. 99-111, 2000.
- COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, v. 66, p. 860-867, 2006.
- DAVIS, R.O.; SIEMERS, R.J. Derivation and reliability of kinematic measures of motion. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 857-869, 1995.

De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction*, v. 10, n. 1, p. 15-21, 1995.

ESHRE, Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Human Reproduction*, v. 13, n. 1, p. 142-145, 1998.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 1-16, 1997.

GADELLA, B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science*, v. 107, p. 229-236, 2008.

GIL, J. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biciphos-Plus and Trilady. *Reproduction in Domestic Animals*. v. 35, p. 69-77, 2000.

GIL, J.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology* v. 54, p. 93-108, 2000.

GUERRA M.M.P.; EVANS G., MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 28, 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.

IGBAL, N.; HUNTER, A.G. Effect of various capacitation systems on bovine sperm motion characteristics, acrosome integrity, and induction of hyperactivation. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 91-102, 1995.

MARCHESI, D.E.; FENG, H.L. Sperm DNA integrity from sperm to egg. *Journal of Andrology*, v. 28, n. 4, p. 481-489, 2007.

MIES FILHO, A. *Reprodução dos Animais*. 6. ed., Porto Alegre : Sulina. 1987. 314p.

MOLINA, M.R. El estrés oxidativo y el destino celular. *Revista Química Viva*, v. 2, n. 1, 2003.

MORTIMER, S.T. Casa- Practical aspects. *Journal of Andrology*, v. 21, p. 515-524, 2000.

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

- NONOGAKI, T.; NODA, Y.; NARIMOTO, K.; UMAOKA, Y.; MORI, T. Effects of superoxide dismutase on mouse in vitro fertilization and embryo culture system. *Journal of Assisted Reproduction Genetics*, v. 9 p. 274-280, 1992.
- RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.J.; SPARKS, R.L.; SIKKA, S.S. Sperm-damaging effects of electric current: possible role of free radicals. *Reproduction Toxicology*, v. 8 p. 427-432, 1994.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, v. 38, p. 1-36, 1995.
- SILVA, G.A.; SOUZA, B.B.; ALFARO, C.E.P.; AZEVEDO, S.A.; NETO, J.A.; SILVA, E.M. N.; SILVA, A.K. Efeito das épocas do ano e de turno sobre os parâmetros fisiológicos e seminais de caprinos no semi-árido paraibano. *Agropecuária Científica no Semi-Árido*, v. 1, p. 7-14, 2005.
- SIMPLÍCIO, A.A.; SANTOS, D.O. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos em regiões tropicais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2005, Goiânia, *Anais...* Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005, p. 136-148.
- SUAREZ, S.S.; HO, H.C. Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 38, p. 119-124, 2003.
- SUNDAMARAN, M.N.; EDWIN, M.J. Cryopreservation of Boer goat spermatozoa during cryopreservation cycle. *Journal of Veterinary Research*, v. 10, n. 21, p.117-124, 2006.
- TARDIF, A.L.; FARREL, P.B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R.H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 1606-1612, 1997.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-1, p. 481-492, 2000.
- YU, T.W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutation Research*, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.
- ZINI, A.; LIBMAN, J. Sperm DNA damage: Clinical significance in the era of assisted reproduction. *Canadian Medical Association Journal*, v. 175, n. 5, p. 494-500, 2006.

**Tabela 1** - Média  $\pm$  desvio padrão do percentual de espermatozoides caprinos com alto potencial da membrana mitocondrial (PMM) e da cinética espermática em amostras de sêmen criopreservadas em leite desnatado acrescido de glicerol (7%), suplementados com superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), em diferentes concentrações

Parâmetros	Grupos Experimentais							
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
aPMM (%)	46,13 $\pm$ 8,00	41,00 $\pm$ 12,06	29,38 $\pm$ 12,27	44,00 $\pm$ 12,96	30,88 $\pm$ 12,82	40,00 $\pm$ 9,64	48,25 $\pm$ 9,45	29,63 $\pm$ 12,31
MT (%)	38,37 $\pm$ 11,2	37,9 $\pm$ 17,8	43,55 $\pm$ 13,80	45,80 $\pm$ 23,60	32,10 $\pm$ 17,43	25,55 $\pm$ 15,71	24,42 $\pm$ 17,85	37,73 $\pm$ 22,48
MP (%)	12,17 $\pm$ 5,78	8,30 $\pm$ 4,70	14,17 $\pm$ 3,79	14,97 $\pm$ 7,69	5,87 $\pm$ 4,27	6,22 $\pm$ 4,33	4,70 $\pm$ 3,81	8,20 $\pm$ 4,81
VCL ( $\mu$ m/s)	64,60 $\pm$ 8,71	63,55 $\pm$ 8,1	65,92 $\pm$ 6,76	71,37 $\pm$ 11,03	56,92 $\pm$ 14,09	54,07 $\pm$ 19,44	58,27 $\pm$ 8,13	65,22 $\pm$ 5,12
VSL ( $\mu$ m/s)	27,66 $\pm$ 3,03	25,2 $\pm$ 3,16	28,85 $\pm$ 2,36	30,82 $\pm$ 3,94	22,07 $\pm$ 5,54	22,90 $\pm$ 8,81	23,57 $\pm$ 2,74	25,90 $\pm$ 2,97
VAP ( $\mu$ m/s)	37,17 $\pm$ 3,24	35,82 $\pm$ 3,74	38,67 $\pm$ 3,36	42,10 $\pm$ 5,69	31,20 $\pm$ 6,89	31,5 $\pm$ 10,92	31,75 $\pm$ 4,49	36,50 $\pm$ 2,02
LIN (%)	42,95 $\pm$ 1,74	39,95 $\pm$ 5,50	43,82 $\pm$ 2,25	43,50 $\pm$ 3,85	36,25 $\pm$ 7,01	40,75 $\pm$ 1,51	40,60 $\pm$ 2,62	39,87 $\pm$ 5,03
STR (%)	74,37 $\pm$ 2,48	70,47 $\pm$ 6,82	74,70 $\pm$ 3,30	70,97 $\pm$ 6,36	70,25 $\pm$ 3,98	71,5 $\pm$ 4,99	72,07 $\pm$ 5,54	70,85 $\pm$ 4,83
ALH ( $\mu$ m)	3,27 $\pm$ 0,23	3,30 $\pm$ 0,32	3,25 $\pm$ 0,31	3,17 $\pm$ 0,22	3,22 $\pm$ 0,72	2,75 $\pm$ 1,19	2,92 $\pm$ 0,56	3,05 $\pm$ 0,82
BCF (Hz)	12,30 $\pm$ 0,97	12,57 $\pm$ 0,86	13,02 $\pm$ 0,73	12,52 $\pm$ 0,51	10,77 $\pm$ 4,22	10,7 $\pm$ 5,13	10,75 $\pm$ 2,46	11,97 $\pm$ 1,87
WOB (%)	57,77 $\pm$ 2,79	56,5 $\pm$ 2,71	58,72 $\pm$ 1,53	59,12 $\pm$ 1,87	55,10 $\pm$ 2,14	57,07 $\pm$ 2,41	54,50 $\pm$ 3,87	56,12 $\pm$ 3,88

MT = Motilidade Total; MP = Motilidade Progressiva; VCL = Velocidade Curvilínea; VSL = Velocidade Linear Progressiva; VAP = Velocidade de Trajeto; LIN = Linearidade; STR = Retilinearidade; ALH = Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça; BCF = Frequência de Batimentos Flagelar Cruzado; WOB = Index de Oscilação; G1= Leite desnatado (grupo controle); G2= Leite desnatado + 25U/mL de SOD; G3= Leite desnatado + 50U/mL de SOD; G4= Leite desnatado + 100U/mL de SOD; G5= Leite desnatado + 25U/mL de CAT; G6= Leite desnatado + 50U/mL de CAT; G7= Leite desnatado + 100U/mL de CAT; G8= Leite desnatado + 100U/mL de SOD + 25U/mL de CAT.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os organismos vivos buscam constantemente um equilíbrio interno e com a natureza, que favoreça a sobrevivência, o crescimento e a reprodução. Nos últimos anos várias pesquisas foram realizadas objetivando esclarecer o papel dos radicais livres em processos metabólicos envolvidos nos sistemas biológicos. O conhecimento sobre a ação dos oxidantes e antioxidantes encontrados no sêmen dos animais domésticos está iniciando e talvez sejam responsáveis pelos ainda ineficientes resultados obtidos após os procedimentos de criopreservação em algumas espécies e sua posterior utilização em técnicas de reprodução assistida, como inseminação artificial e fertilização *in vitro*.

Observou-se com a realização desse experimento que a adição dos antioxidantes ao diluente de congelamento do sêmen caprino deve ser mais estudada, em virtude de se ter observado que as enzimas SOD e CAT apresentaram efeitos benéficos à ultraestrutura dos espermatozoides criopreservados de caprinos, sugerindo que o uso de diferentes concentrações destas substâncias pode aumentar a viabilidade *in vitro* e *in vivo* destes gametas criopreservados.