

PAULO CÉSAR VASCO DE ALBUQUERQUE PEIXOTO

**ADIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES TROLOX E GLUTATIONA
REDUZIDA AO DILUIDOR DE CRIOPRESERVAÇÃO
DE SÊMEN DE CÃES**

RECIFE

2008

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

PAULO CÉSAR VASCO DE ALBUQUERQUE PEIXOTO

ADIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES TROLOX E GLUTATIONA
REDUZIDA AO DILUIDOR DE CRIOPRESERVAÇÃO
DE SÊMEN DE CÃES

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

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

RECIFE

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

P379a Peixoto, Paulo César Vasco de Albuquerque
Adição dos antioxidantes Trolox e glutathione reduzida ao
diluidor de criopreservação de sêmen de cães / Paulo Cé -
sar Vasco de Albuquerque Peixoto. -- 2008.
55 f. : il.

Orientadora : Maria Madalena Pessoa Guerra
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Uni -
versidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de
Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 636.708 926 1

1. Cão
2. Sêmen
3. Congelação
4. Trolox
5. Viabilidade espermática
6. Glutathione reduzida
- 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

**EFEITO DA ADIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES TROLOX E
GLUTATIONA REDUZIDA AO DILUIDOR DE CRIOPRESERVAÇÃO
DE SÊMEN DE CÃES**

Dissertação de Mestrado elaborada por

Paulo César Vasco de Albuquerque Peixoto

Aprovada em: 15 de Fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra/UFRPE
Orientadora

Prof. Dr. Antonio Rodrigues da Silva/UFMT

Prof. Dr. Pierre Castro Soares/UFRPE

Dra. Zoraide Fernandes Coletto

A **Cássia**, querida e amada esposa, pela sua paciência, sabedoria, profundo afeto e compreensão nos momentos de ausência e de estresse.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo fôlego de vida, sabedoria, fé, humildade, proteção e por sempre iluminar meus caminhos;

Aos meus Pais, por terem me preparado para a vida;

À minha irmã Ana, meu cunhado Jairo e minha sobrinha Bibica, pela paciência, preocupação, dedicação, e pelo ombro amigo sempre com palavras de incentivo e apoio;

Aos meus irmãos Neto e Júnior, que apesar da “distância” sempre estarão no meu coração;

À minha sogra (*in memoriam*), pelas palavras de incentivo que me fortaleceram nos momentos mais difíceis;

À Prof^a Dr^a Maria Madalena Pessoa Guerra, agradeço não só a orientação, mas também pela dedicação, preocupação, solidariedade, amizade, carinho e confiança;

Às amigas, Maria Tânia Bezerra Guedes, Márcia Maria Alves de Santana, Sandra Christina Silva de Farias e Ione Almeida de Andrade, por terem me estimulado, auxiliado e compreendido minha ausência;

Aos meus queridos amigos Dona Sônia, Mércia, Lamartine, Márcia e Sarah, pelo acolhimento, carinho, e atenção dispensados;

Aos amigos, André, Andréia, Adriana, Diogo, Lígia, Karen, Rômulo, Sandra Regina e Sildivâne pelo incentivo, atenção, disponibilidade, ensinamentos e colaboração imprescindível que culminaram com a concretização deste trabalho;

Ao amigo Roberto, companheiro de viagem, pela amizade e apoio;

Aos Professores Nazaré Fonseca de Souza, Washington Luís, Érika Christina Santos Oliveira, Márcia Brayner Paz Barreto, Pierre Castro Soares e Lêucio Câmara Alves, pelo auxílio e amizade;

Ao Prof. Edmilson Mazza, pelo auxílio na realização da análise estatística;

Às amigas Zoraide e Cristiane, pela ajuda nas coletas e amizade durante as longas jornadas, cujas participações foram de fundamental importância para a execução desse estudo;

A madrinha Prof^a Dr^a Sandra Cristina Becker da Silva, pela valiosa ajuda no Inglês, no Alemão, amizade e palavras de incentivo;

Aos estagiários, Ana, Cibele, Clarice, Camila, Ellen, Felipe, Francine, Jobson e Wagner, pelo auxílio durante a realização do experimento;

Aos funcionários, Joana, Alcir, Dona Sônia, Guiomar e Ana Karina, pela amizade e ajuda fundamental para a execução deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, em nome da coordenadora Prof^a Dr^a Áurea Wischral e da secretária Edna Cherias, e aos professores, pela atenção, dedicação dispensada, pois sempre estiveram prontos para esclarecer qualquer dúvida;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Canil Brave Basset, na pessoa de Tatiana Pagliane, e aos funcionários, Midiam, Armando e Ernandi, por terem permitido a utilização dos cães, das instalações, e auxiliado na realização deste experimento;

Ao Canil de Fila Brasileiro de Aldeia, na pessoa do Dr. Raimundo, pela incansável paixão e dedicação aos animais;

Aos cães Bono, Eddie, Popó e Wilke. Os meus mais sinceros agradecimentos, sem a colaboração de vocês não seria possível a realização deste trabalho;

A todos que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“... O tempo é algo que não volta atrás. Por
isso plante seu jardim e decore sua alma, Ao
invés de esperar que alguém lhe traga flores ...”

William Shakespeare

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: Porcentual

AI: Acrossomas intactos

AR: Acrossomas reagidos

ATP: Adenosina Trifosfato

BSA: Albumina sérica bovina

CAT: Catalase

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DP: Desvio Padrão

Fe⁺²: íon ferro

FADH: Dinucleotídeo de Flavina e Adenina (reduzido)

GR: Glutathione Redutase

GSH: Glutathione

GSHPx: Glutathione Peroxidase

GSSH: Glutathione Oxidada

GST: Glutathione Transferase

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

HO₂: Radical Perhidroxil

IA: Inseminação Artificial

Kg: Quilograma

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade

LPO: Peroxidação lipídica

M: Média

MF: Motilidade Final

mg: Miligrama

MI: Motilidade inicial

min: minuto

MP: Motilidade progressiva

MT: Motilidade Total

NADPH: Dinucleotídeo de Adenina, Nicotinamida e Fosfato (reduzido)

NADH: Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida (reduzido)

nmol: Nanomolar

NO^- : ânion Nitroxila

NO^+ : Cátion Nitrosonium

NO_2 : Óxido Nítrico

$^1\text{O}_2$: Oxigênio singlet

O_2^- : Radical Superóxido ou Ânion

OH^\bullet : Radical Hidroxila

ONOO^- : Peroxinitrito

PBS: Fosfato salino tamponado

pH: Potencial hidrogeniônico

PV: Peso vivo

RNA: Ácido Ribonucléico

RO^\bullet : Carbonila Excitada

RO^\bullet : Radical Alcoxil

ROO^\bullet : Radical Peroxil

ROOH : Hidroperóxido Orgânico

ROS: Espécies Reativas a Oxigênio

SOD: Superóxido Dismutase

SOX: Estresse oxidativo

TRIS: Tris-Hidroximetil-Aminometano

TROLOX: Ácido Carboxílico- 6- hidroxil - 2,5,7,8 tetrametil - croman- 2- óico

TTR: Teste de termorresistência

UFRPE: Universidade Federal Rural de Pernambuco

v:v: Volume:Volume

VE: vitamina E

μM : micromolar

RESUMO

Com o objetivo avaliar o efeito da adição dos antioxidantes Trolox e Glutathione reduzida (GSH) na viabilidade *in vitro* de espermatozoides criopreservados de cães, amostras de sêmen foram colhidas de animais das raças Buldogue Francês (n=1), Basset Hound (n=2) e Rottweiler (n=1), através de manipulação digital. A seguir, procedeu-se à avaliação macroscópica (cor, aspecto, volume) e microscópica (motilidade progressiva, vigor, concentração, integridade do acrossoma e do DNA, e estresse oxidativo), e divisão do volume de sêmen em quatro alíquotas, de acordo com os experimentos e grupos experimentais. Experimento 1: G1 = Tris-gema (Grupo Controle); G2 = Tris-gema + 200 μ M de Trolox e G3 = Tris-gema + 300 μ M de Trolox; Experimento 2: G1 = Tris-gema (Grupo Controle); G2 = Tris-gema + 2 μ M de GSH e G3 = Tris-gema + 5 μ M de GSH; Experimento 3: G1) Tris-Gema (Grupo Controle); G2) Tris-Gema + 200 μ M de Trolox; G3) Tris-Gema + 2 μ M de GSH; G4) Tris-Gema + 200 μ M Trolox + 2 μ M de GSH. As amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL), criopreservadas em máquina de congelação (TK 3000) e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C). Após descongelação a 37 °C (0 min) e incubação durante 60 minutos, constatou-se que os resultados de MP, vigor e porcentual de espermatozoides com acrossomas íntegros evidenciaram diferença significativa ($P < 0,05$) apenas entre os tempos de incubação, nos três experimentos. No Exp. II, os grupos experimentais (G2 e G3) apresentaram maior ($P < 0,05$) porcentual de células sem estresse oxidativo. Conclui-se que o tempo de incubação interfere na viabilidade *in vitro* das células espermáticas, independente da adição de antioxidantes Trolox e/ou GSH; recomenda-se a adição do antioxidante GSH, nas concentrações de 2 μ M e 5 μ M, ao diluente utilizado para criopreservação do sêmen de cães.

Palavras-chave: Criopreservação, viabilidade, sêmen, antioxidante, cães.

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of adding antioxidants Trolox and Glutathione reduced on the *in vitro* viability of dog cryopreserved sperm, semen samples were harvested from animals of the breeds French Bulldog (n=1), Basset Hound (n=2) e Rottweiler (n=1), through digital manipulation. Then proceeded to the evaluation macroscopic (color, appearance, volume) and microscopic (progressive motility, vigor, DNA, acrosome integrity and oxidative stress), followed by dividing the volume of semen on four aliquots, according to the experiments and experimental groups: Experimental 1 - G1 = Tris- Egg yolk (control group); G2 = Tris- Egg yolk + 200 μ M of Trolox and G3 = Tris- Egg yolk + 300 μ M of Trolox; Experimental 2 - G1 = Tris- Egg yolk (Control group); G2 = Tris- Egg yolk + 2 μ M of GSH and G3 = Tris-Egg yolk + 5 μ M of GSH; Experimental 3 - G1 = Tris- Egg yolk (control group); G2 = Tris- Egg yolk + 200 μ M of Trolox; G3 = Tris- Egg yolk + 2 μ M of GSH and G4 = Tris- Egg yolk + 200 μ M of Trolox + 2 μ M of GSH. The samples were packaged in straws (0.25 mL), cryopreserved in freezing machine (TK3000) and stored in liquid nitrogen (-196 °C). After thawing a 37 °C and incubation during 60 minutes, it was detected that MP, vigor and sperm with intact acrosomes had significant difference ($P < 0.05$) only among incubation times, on the three experiments. In the Exp. 2, G2 and G3 groups had higher ($P < 0.05$) percentage of sperm with oxidative stress. So, it can be concluded that the incubation time interfere on the *in vitro* viability of the sperm cells, independently of Trolox and GSH addition; and GSH, on the concentration of 2 and 5 μ M, should be added to diluent of dog semen cryopreservation.

Keywords: Cryopreservation, viability, semen, antioxidant, dog.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	
SUMÁRIO	
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Conservação do sêmen de cão.....	14
2.2 Parâmetros para avaliação da qualidade do sêmen.....	15
2.3 Formação de Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS)	16
2.3.1 Radical Hidroxila (-OH)	18
2.3.2 Ânion Superóxido (O_2^-).....	18
2.3.3 Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	18
2.3.4 Óxido nítrico (NO_2)	19
2.4 Ação das ROS nos sistemas biológicos.....	19
2.5 Efeito das ROS no sêmen.....	20
2.6 Sistemas Celulares de Defesa Antioxidante.....	22
2.6.1 Glutathiona (GSH)	22
2.6.2 Vitamina E (α - Tocoferol)	24
2.7 Influência dos antioxidantes na fertilidade masculina.....	25
3 REFERÊNCIAS.....	27
4 EXPERIMENTO.....	36
4.1 Efeito da adição de Trolox e Glutathiona reduzida (GSH) na viabilidade <i>in vitro</i> de espermatozóides de cães.....	37

1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento da cinofilia, da comercialização de animais e do intercâmbio entre os criadores de todo o mundo, constatou-se aumento no uso de biotécnicas reprodutivas em cães (*Canis familiares*), objetivando melhorar e difundir diferentes raças ou preservar canídeos silvestres. Dentre as diversas biotécnicas reprodutivas, tem-se destacado a criopreservação de sêmen que possibilita melhor aproveitamento de ejaculados de um mesmo reprodutor, assim como a propagação deste material genético (SILVA et al., 2001).

As técnicas de criopreservação de sêmen causam diminuição da fertilidade devido, principalmente, a lesões estruturais e funcionais dos espermatozóides advindas do estresse térmico (MORTON e BRUCE, 1989; JASKO, 1994). Por conseguinte, o caráter bioquímico dos componentes dos diluidores, a forma como interagem com os espermatozóides e a possibilidade de sua metabolização ou os possíveis efeitos adversos aos espermatozóides devem ser cuidadosamente avaliados.

A criopreservação é uma das técnicas mais estudadas no sêmen dos canídeos, porém existem ainda algumas descobertas a serem realizadas para padronização desta metodologia, devido principalmente às particularidades inerentes a esta espécie. Segundo Silva e Verstegen (1995 apud BUENO et al., 2001), o meio diluidor constitui um dos fatores críticos para a congelação de sêmen. Desta forma, diferentes substâncias têm sido testadas visando obter aquela que melhor preserva a viabilidade dos espermatozóides desta espécie. Para se obter sucesso no processo de congelação de um ejaculado é necessária adição de um diluidor que ajude a estabilizar o metabolismo celular, prevenir a capacitação e a reação precoce do acrossomo, assim como conservar a integridade e a função de todos os compartimentos espermáticos, preservando a viabilidade dos espermatozóides (WATSON, 1995; WATSON, 2000). Neste contexto, é importante que se leve em consideração detalhes técnicos e características específicas da célula espermática canina, ou seja, a variabilidade individual e racial (MORTON e BRUCE, 1989; SOUZA et al., 1995; CHIRINÉA et al., 2003; CHIRINÉA, 2004).

Os espermatozóides são susceptíveis a danos peroxidativos por apresentarem em suas membranas grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (POULOS et al., 1973). Os danos peroxidativos induzem à formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS), uma das principais causas da redução da viabilidade e da fertilidade dos espermatozóides (HSU et al.,

1998), sendo um dos fatores que age negativamente sobre a célula espermática durante o processo de refrigeração e congelação do sêmen (CUNHA, 1997; BILODEAU et al., 2001). Estudos têm revelado que estes gametas têm capacidade de produzir grandes concentrações de ROS, as quais podem reduzir a viabilidade dos espermatozóides (ALVAREZ e MORAES, 2006) devido a alterações estruturais, como perda de acrossoma, e de metabolismo, caracterizada por redução da motilidade (JONES e MANN, 1977).

Para se proteger do efeito letal da formação excessiva de ROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante no plasma seminal (SIKKA et al., 1995; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Inúmeros antioxidantes têm sido utilizados no tratamento de machos inférteis, como vitamina C, vitamina E, glutathione e coenzima Q10 (SINCLAIR, 2000). Ao fornecer dietas com concentrações adequadas de antioxidantes, especialmente a vitamina C e E, ocorre a redução de danos das membranas celulares (EICHNER, 1994).

Métodos avaliadores da integridade das membranas espermáticas têm sido utilizados na avaliação da eficácia de diferentes biotécnicas de criopreservação do sêmen (CUNHA, 2002), como o uso de sondas fluorescentes.

A tecnologia da criopreservação do sêmen de cão vem evoluindo e buscando novas biotécnicas e diluidores na tentativa de minimizar os danos celulares durante estes processos. Desta forma, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da adição dos antioxidantes Trolox e Glutathione reduzida ao diluidor utilizado para criopreservação do sêmen de cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conservação do sêmen de cão

As biotécnicas da reprodução, como refrigeração, congelação do sêmen e inseminação artificial (IA) são utilizadas há bastante tempo em várias espécies animais, principalmente as de interesse comercial. A maioria das técnicas e meios diluidores desenvolvidos na conservação de sêmen ovino, bovino, suíno e eqüino são usados na conservação do sêmen de cão e de outros animais domésticos e selvagens (MESSIAS, 2000).

Os primeiros animais prenhes obtidos após IA foram cadelas utilizando sêmen fresco em estudos conduzidos pelo abade Lazzaro Spallanzani no ano de 1780, na Itália, originando o nascimento de três produtos vivos e normais (MIES FILHO, 1987).

Em seguida, Elias Ivanov demonstrou que a fecundação era possível mesmo quando se substituíam os líquidos produzidos pelas glândulas anexas masculinas por soro artificial. Esse mesmo pesquisador esclareceu a dinâmica do uso de baixas temperaturas na conservação do sêmen para IA (MIES FILHO, 1987).

Harrop (1961) descreveu a utilização de sêmen in natura e refrigerado de cães na IA, que, após ser transportado durante seis dias, resultou em gestação de uma cadela. Com a descoberta acidental da ação crioprotetora do glicerol por Polge et al. (1949), várias pesquisas foram desenvolvidas visando obter metodologias de criopreservação de células espermáticas em diversas espécies, com o primeiro sucesso na congelação do sêmen de cão descrito por Rowson (1954). No ano de 1969, Seager obteve a primeira gestação em cadela, utilizando o sêmen criopreservado diluído em lactose acrescida de 4% de glicerol e 20% de gema de ovo, onde obteve motilidade espermática entre 40 e 50% após descongelação e possibilitou o nascimento de dois filhotes após inseminação intravaginal (ENGLAND, 1993).

O sêmen adequadamente diluído pode ser congelado por tempo indeterminado, preservando seu potencial fecundante quando descongelado e utilizado em programas de IA. Desse modo, faz-se necessário o uso de um diluidor que contenha nutrientes, sirva como tampão ajustando as alterações do pH; promova a pressão osmótica e concentração de eletrólitos dentro dos padrões fisiológicos; previna o crescimento de bactérias; proteja as células contra o choque térmico durante o processo de refrigeração e possua crioprotetores que reduzam os danos às células espermáticas durante a congelação e posterior descongelação (CONCANNON e BATISTA, 1989).

Os primeiros experimentos para a preservação do sêmen de cão por diferentes períodos tiveram início através da adaptação empírica de substâncias usadas para a refrigeração e congelação do sêmen bovino, utilizando-se diluidores à base de leite desnatado (MARTIN, 1963 apud SILVA, 2001), citrato (HARROP, 1961), cloreto de fosfato (WALES e WHITE, 1963), lactose (SEAGER, 1969), Tris (GILL, et al., 1970) e Tris-frutose-citrato (FOOTE, 1964; ANDERSEN, 1975). Entretanto, a gestação na maioria das pesquisas (LINDE-FORSBERG et al., 1999; ROTA et al., 1999) tem sido alcançada utilizando-se modificações na metodologia de congelação, preconizando-se o uso do diluidor Tris-gema-glicerol (DAVIS et al., 1963 apud SILVA, 2001).

Foram identificados componentes específicos na gema de ovo responsável pela preservação dos espermatozóides de ovino e bovino durante seu armazenamento em baixa temperatura. Durante o choque térmico, os fosfolipídios da gema de ovo interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e proporcionam a proteção da mesma. As lipoproteínas ligam-se à membrana da célula espermática e ajudam a preservar a integridade celular durante o armazenamento (BOUCHARD et al., 1990).

2.2 Parâmetros para avaliação da qualidade do sêmen

A motilidade das células espermáticas é utilizada como parâmetro na avaliação da qualidade do sêmen, servindo também para estudar a aptidão de um diluente nos ensaios laboratoriais. Para que as células espermáticas consigam atravessar a zona pelúcida do ovócito no momento da fecundação é necessário que elas tenham boa motilidade e acrossomas íntegros (MAHI e YANAGIMACHI, 1978).

Todavia, a capacidade de fecundação de espermatozóides encontrados no sêmen diluído e congelado de touros está mais relacionada à integridade dos acrossomas do que à motilidade (SAACKE e WHITE, 1972). Devido a esse fato, estes dois parâmetros devem ser observados conjuntamente (SAACKE e WHITE, 1972; MAHI e YANAGIMACHI, 1978).

Oettlé (1986) observou a ocorrência de várias alterações nas membranas dos espermatozóides durante o armazenamento a baixas temperaturas, assemelhando-se ao processo de reação do acrossoma, e verificou que tais mudanças não parecem estar correlacionadas com a motilidade espermática em cães. Posteriormente, Morton e Bruce (1989) sugeriram que anormalidades morfológicas na peça intermediária e na cauda do espermatozóide podem reduzir sua motilidade após descongelação.

No sêmen *in natura* de cão foi encontrada relação entre motilidade espermática e integridade acrossomal, fato não confirmado em amostras de sêmen diluídas e congeladas (OETTLÉ, 1986). Todavia no sêmen *in natura*, diluído e congelado de cães, foi observado correlação positiva entre fertilidade e integridade acrossomal (FROMAN et al., 1984).

2.3 Formação de Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS)

De acordo com Halliwell e Gutteridge (1989), o oxigênio é o elemento que, na classificação periódica dos elementos químicos, pertence à família 6A, cujo número atômico e massa atômica são 8 e 16, respectivamente, e que possui 8 elétrons distribuídos nas suas camadas orbitárias. Aproximadamente 95 a 98% do oxigênio absorvido (Figura 1) pelos organismos aeróbicos é reduzido, formando-se água na cadeia respiratória através do transporte de elétrons na mitocôndria, bem como no retículo endoplasmático, onde o sistema enzimático citocromo, no processo de fosforilação oxidativa, procede a redução tetravalente do O_2 pelo sistema citocromo oxidase, fornecendo simultaneamente 4 elétrons para o oxigênio, que se reduz à água.

As fontes que cedem os cátions de hidrogênio e os elétrons para a reação são, basicamente, NADH, FADH e ubiquinona (ou coenzima Q). Entretanto, de 2 a 5% do O_2 é reduzido univalentemente, processo em que uma molécula recebe apenas um elétron, que vai ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua desemparelhado, produzindo intermediários altamente reativos, denominados de espécies reativas ao oxigênio (ROS), que algumas vezes constituem os radicais livres: $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$ (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Perón et al. (2001) descreveram alguns fatores que proporcionam a produção de radicais livres: 1) Químicos – aumento dos metais pesados, xenobióticos e componentes do tabaco; 2) Físicos – radiação ultravioleta; e 3) Orgânicos e metabólicos – dieta hipercalórica, dieta pobre em antioxidantes, diabetes, processos inflamatórios e traumatismos, fenômenos de isquemia, reperfusão e exercícios extenuantes.

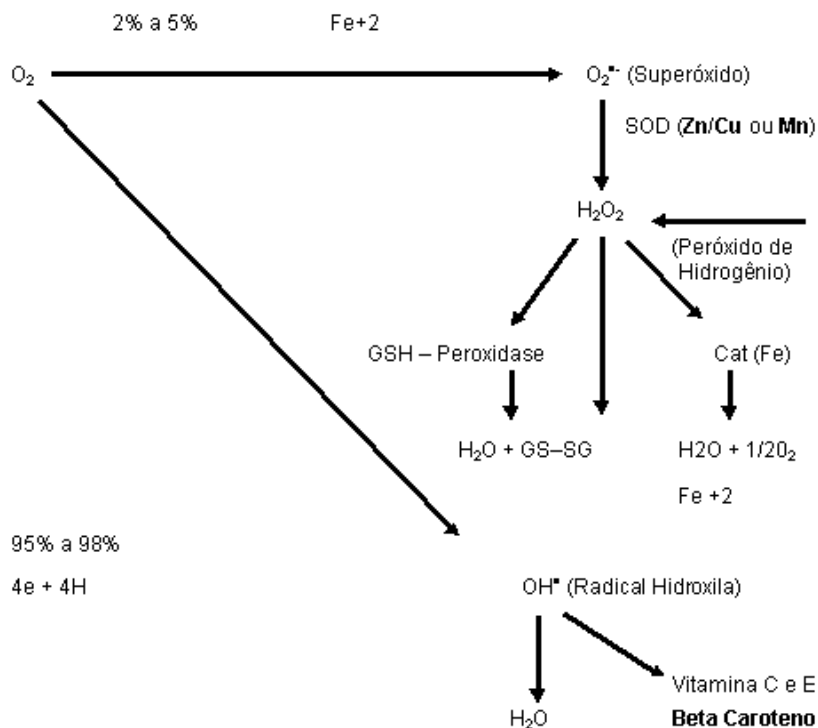


Figura 1 – Esquema da formação de ROS. SOD – Superóxido dismutase; Cat – Catalase; $O_2^{\bullet -}$ – Ânion superóxido; O_2 – Oxigênio; GS-SG – Glutathione Oxidada; GSHPx – Glutathione Peroxidase; H_2O – Água; OH^{\bullet} – Radical Hidroxila; GSH – Glutathione Reduzida; H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio. Fonte: Halliwell e Gutteridge (1989).

Existem vários tipos de ROS (Tabela 1) e a sua formação se dá primeiramente pelo radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), que pode ser dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou mesmo através de ação catalítica, pela atuação da enzima superóxido dismutase (SOD). No organismo existem duas SODs principais, uma citoplasmática, que é a CuZnSOD contendo Cobre-Zinco na molécula, e outra mitocondrial, que é a MnSOD contendo Manganês na sua estrutura (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Tabela 1: Espécies reativas ao oxigênio (ROS)

$O_2^{\cdot -}$	Ânion superóxido ou radical superóxido
HO_2^{\cdot}	Radical perhidroxil
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
OH^{\cdot}	Radical hidroxila
RO^{\cdot}	Radical alcóxil
ROO^{\cdot}	Radical peróxil
$ROOH$	Hidroperóxido orgânico (ex.: lipoperóxido)
1O_2	Oxigênio singlet
RO^{\cdot}	Carbonila excitada

Fonte: Sies (1991)

2.3.1 Radical Hidroxila (-OH)

É formado a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), numa reação catalisada por íons de metais (Fe^{2+} ou Cu^+), geralmente ligados em complexos com proteínas como a ferritina (HALLIWELL, 1991). Provavelmente é a ROS que mais causa danos aos sistemas biológicos, devido ao seu alto poder de reagir com biomoléculas (HALLIWELL, 1987).

2.3.2 Ânion Superóxido ($O_2^{\cdot -}$)

A formação do Superóxido acontece espontaneamente, especialmente em ambiente aeróbico, rico em elétrons, próximo à membrana mitocondrial interna devido à liberação de elétrons da cadeia respiratória. Esta ROS é gerada a partir da molécula de oxigênio através da adição de um elétron e, apesar de ser um radical livre, não é altamente reativo, pois não consegue penetrar em membranas lipídicas, ficando restrito ao compartimento onde é produzido (NORDEBERG e ARNÉR, 2001).

2.3.3 Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

É produzido a partir do ânion superóxido após uma reação de dismutase. O H_2O_2 não é um radical livre, porém é de grande importância devido à sua habilidade em penetrar membranas biológicas. Esta substância atua como intermediária na formação de mais moléculas de ROS, como o radical hidroxila (OH^\cdot), formado pela oxidação de metais de transição. O principal metal de transição responsável pela transformação do H_2O_2 em OH^\cdot é o ferro, através da reação de Fenton (NORDEBERG e ARNÉR, 2001).

Embora não seja muito reativa, esta ROS é um agente capaz de inativar enzimas, principalmente por oxidação de grupamentos tióis essenciais. Seu maior poder oxidante, entretanto, é indireto: como gerador do radical hidroxila e pela interação com o radical superóxido. Nesse caso, ele é um potente oxidante e, em concentrações suficientes, pode matar qualquer célula, apesar de, na presença de ferro, sua toxicidade pode aumentar de 10 a 1000 vezes (EATON, 1991).

2.3.4 Óxido nítrico (NO_2)

É um gás formado em meio aquoso através da conversão de arginina, na presença de oxigênio e diversos co-fatores, em citrulina e o NO_2 pela ação de óxido nítrico-sintetase (NOS) (KNOWLES et al., 1989).

2.4 Ação das ROS nos sistemas biológicos

Por reagirem com a maioria das moléculas do organismo, as ROS são capazes de interferir nos processos biológicos, causando diversas doenças, mutações, envelhecimento e outras alterações (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

A mitocôndria constitui a principal fonte de radicais livres. Este fenômeno ocorre na cadeia de transporte de elétrons, que é a última etapa de produção de prótons de alta energia, cuja passagem através da membrana interna mitocondrial gera um gradiente elétrico que aporta a energia necessária para formar o ATP (TURRENS, 1994).

O exercício físico está associado ao aumento da geração de radicais livres, principalmente devido ao elevado aumento no consumo de O_2 pelos tecidos ativos (COOPER et al., 2002). Pesquisadores demonstraram que a quantidade de radicais livres nos tecidos biológicos está aumentada após o exercício agudo e/ou crônico e que esse aumento coincide com a presença de danos teciduais (BLOOMER e GOLDFARB, 2004). Contudo, uma ligação direta entre a produção de radicais livres e alterações fisiológicas e/ou bioquímicas ainda não está completamente estabelecida.

2.5 Efeito das ROS no sêmen

Segundo De Lamirande e Gagnon (1992a), a produção celular de ROS foi observada pela primeira vez em espermatozóides de mamíferos no final dos anos 40. Os espermatozóides são susceptíveis a danos peroxidativos por apresentarem em suas membranas grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados e baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu citoplasma reduzido (POULOS et al., 1973). Os danos peroxidativos induzem à formação de ROS, que é uma das maiores causas da redução da viabilidade e da fertilidade dos espermatozóides (HSU, 1998).

Uma das hipóteses que envolvem a diminuição da qualidade do sêmen dos animais é a maior produção de ROS, que são os radicais livres, isto é, átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados (STRYER, 1996). Vários pesquisadores relataram que os gametas masculinos constituem a principal fonte destes radicais livres no sêmen (AITKEN et al., 1992). Segundo Aitken e Clarkson (1987), as quantidades de radicais livres gerados por espermatozóides defeituosos são superiores àquelas produzidas pelos gametas morfológicamente normais.

A célula espermática humana exibe a capacidade de produzir ROS quando incubadas em condições anaeróbicas. A produção de ROS ocorre principalmente por células espermáticas anormais e dentre estas se destacam as células que possuem resíduos de citoplasma denominados de gotas citoplasmáticas proximais e distais (GOMES et al., 1998). Acredita-se que a presença deste citoplasma residual aumente a capacidade destas células produzirem NADPH, que serve como fonte de elétrons para a produção de ROS (AITKEN e BAKER, 2002).

A produção de ROS por espermatozóides imóveis, funcional e/ou morfologicamente anormais ocorre, provavelmente, devido à inativação dos sistemas antioxidantes (RHEMREV et al., 2001). Segundo Zini et al. (1993), 40% dos homens inférteis têm quantidades detectáveis de ROS no sêmen, diferindo do sêmen de homens férteis. Estudando sêmen humano, Aitken et al. (1993) observaram que a elevada produção de ROS reduz a motilidade espermática.

Kessopoulos et al. (1994) sugeriram que a maior fonte de produção de ROS são os leucócitos, presentes também em homens férteis. Entretanto, Wollf (1995) constatou que as ROS geradas por leucócitos são deletéria às células espermáticas apenas na ausência de sistemas antioxidantes.

Vários estudos indicam que grandes quantidades de ROS no plasma seminal humano prejudicam a concentração, a motilidade, a morfologia, a capacitação espermática e a reação acrossômica dos espermatozóides (De LAMIRANDE e GAGNON, 1992a; AGARWAL et al., 1994; AITKEN et al., 1995). Estes danos se devem provavelmente à peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana plasmática dos espermatozóides (AITKEN e CLARKSON, 1987; ALVAREZ et al., 1987). A capacitação espermática é essencial para a fertilização e caracteriza-se pela hiperativação do espermatozóide e sua preparação para a reação acrossômica, necessária para o rompimento da membrana externa do ovócito (YANAGIMACHI, 1994).

Os danos causados na motilidade espermática pela ROS se devem, principalmente, a uma seqüência de eventos que resultam na diminuição da fosforilação de proteínas do axonema e, conseqüentemente, na imobilização do espermatozóide, ambos relacionados com a redução na fluidez da membrana plasmática (De LAMIRANDE e GAGNON, 1995).

Estudos *in vitro* indicam que a perda da motilidade espermática pode também estar relacionada à diminuição dos níveis de ATP devido à ação das ROS, ou seja, através do sistema hipoxantina e xantina oxidase ocorre diminuição das concentrações de ATP intracelular espermático e, conseqüentemente, redução da motilidade espermática (De LAMIRANDE e GAGNON, 1992b; AITKEN et al., 1993).

Iwasaki e Gagnon (1992) constataram a geração de ROS em 40% dos pacientes tratados numa clínica de infertilidade. Mazzili et al. (1994) observaram a presença do ânion superóxido em 87% (115/132) das amostras seminais obtidas de homens normozoospermicos inférteis e em 55% (11/20) das amostras seminais de homens inférteis ($P < 0,05$).

O NO_2 é um importante mediador funcional de vários sistemas fisiológicos, incluindo o sistema reprodutivo. Entretanto, quando encontrado em grandes quantidades por períodos longos, principalmente em reações imunológicas, é citotóxico e citostático para as células que o geraram, assim como para os tecidos adjacentes. Pacientes com infecção no sistema urogenital podem apresentar redução na motilidade e na viabilidade espermática (PASQUALOTTO et al., 2000).

Sengoku et al. (1998) verificaram que amostras de sêmen humano incubadas com altas concentrações de NO_2 apresentaram perda de motilidade, viabilidade e capacidade de se ligar a ovócitos sem zona pelúcida e a hemizona, ambas homólogas. Porém, concentrações reduzidas de NO_2 não prejudicaram a motilidade e aumentaram a taxa de capacitação espermática e a taxa de ligação à hemizona homóloga.

Todavia, para que os espermatozóides tenham plena capacidade de desempenhar sua função é fundamental a presença de óxido nítrico no líquido seminal. No entanto, quando encontrado em concentrações elevadas, o poder oxidativo do NO_2 causa danos à estrutura do gameta, diminuindo sua mobilidade e vitalidade (CARVALHO et al., 2002).

2.6 Sistemas Celulares de Defesa Antioxidante

Com a finalidade de se proteger do dano oxidativo, o organismo animal desenvolveu mecanismos de defesa através da produção de substâncias que recebem o nome de antioxidantes e podem ser divididas em dois grandes grupos, de acordo com o nível de defesa primária ou secundária (HATAMOTO, 2004). As defesas primárias atuam de forma preventiva através principalmente das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, promovendo a inativação das ROS antes que ocorra oxidação dos lipídios. As secundárias, como a vitamina E, agem promovendo a eliminação das ROS ou reparando as alterações provocadas pela peroxidação lipídica (SALEH e AGARWAL, 2002).

O sistema antioxidante celular também pode ser dividido em sistemas enzimáticos e não enzimáticos (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Dentre os antioxidantes enzimáticos tem-se o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GSHPx). No sistema não enzimático um grande número de compostos de baixo peso molecular é considerado antioxidantes de relevância biológica, incluindo as vitaminas C e E, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

2.6.1 Glutationa (GSH)

A Glutationa é um tripeptídeo (-glutamilcisteinilglicina) considerado a maior fonte de tiol não protéico (XIANG e OLIVER, 1998), constituindo um dos componentes mais abundantes dos vegetais, essencial para plantas e animais em resposta aos estresses oxidativos. Segundo Agrawal e Vanha-Perttula (1988), sua concentração varia de 0,5 a 10,0 mM e, nos animais, é encontrado em maior concentração no fígado (KIDD, 1997; Figura 2).

Segundo Nordberg e Arnér (2001), a GSH está presente em todas as células vivas aeróbicas e acredita-se que seja o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. A GSH é considerada um dos agentes mais importantes no sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a de lesões resultantes da exposição a agentes como: íons ferro (GALLEANO e PUNTARULO, 1995), oxigênio hiperbárico e radiação (DENEKE e FANBURG, 1989). Também participa da desintoxicação por agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), sendo requerida para a síntese de proteínas e DNA (DENEKE e FANBURG, 1989).

As concentrações de Glutationa são homeostaticamente controladas através da regulação contínua entre a síntese de GSH, por ação da GSH sintetase; a reciclagem de GSSG, a cargo da GSH redutase; e a sua utilização pelas peroxidases, transferases, transhidrogenases e transpeptidases (KIDD, 1997).

A GSH atua como antioxidante e removedor de radicais livres, devido às suas propriedades antioxidantes, e do seu importante papel na proteção contra efeitos lesivos de bactérias, vírus, poluentes e radicais livres. Este efeito deve-se ao fato da GSH apresentar uma potente capacidade em doar elétrons, o que é evidenciado pelo elevado potencial redox negativo do par redox GSH/GSSH. O grupo sulfídrico existente no resíduo cisteína da glutatona é o responsável pela sua capacidade redutora, mais visível nos locais onde a sua concentração é mais elevada. A ação redutora da glutatona consiste na remoção de radicais livres (DRÖGE et al., 1994). O sistema antioxidante de defesa é bem sofisticado e adaptativo e a GSH é a constituinte principal deste sistema. A mitocôndria é o lugar mais importante para a ação da GSH. Nas mitocôndrias de células aeróbicas existe um fluxo constante de radicais livres de oxigênio gerado na síntese do ATP. Estes processos ocorrem através de um complexo sistema enzimático e são designados fosforilação oxidativa (KIDD, 1997).

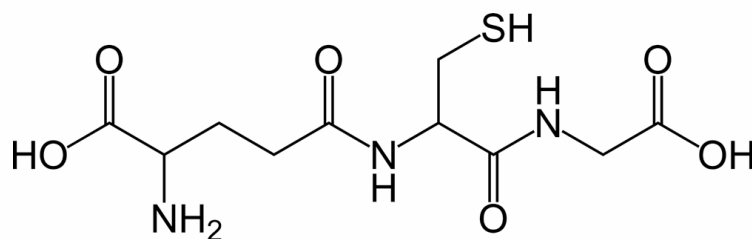


Figura 2 – Estrutura da GSH. (Fonte: KIDD, 1997).

2.6.2 Vitamina E (α – Tocoferol)

Descoberta em 1922 nas folhas dos vegetais pelos pesquisadores Herbert Evans e Katherine Bishop da Universidade da Califórnia, recebeu o nome de vitamina E em 1924. Com base na fertilidade, foi cientificamente denominada de Tocoferol, palavra de origem grega que significa parto (*tokos*) e broto (*phero*), além da terminação “*ol*” introduzida para indicar o álcool presente na propriedade desta molécula (SEN et al., 2006).

A vitamina E é provavelmente o mais importante inibidor da reação em cadeia da peroxidação de lipídios em animais (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). É um antioxidante lipossolúvel amplamente distribuído na natureza em alimentos de origem animal e vegetal, sendo particularmente abundantes nos óleos vegetais. Apresentam atividade vitamínica (E) e possuem um grupo hidroxila no anel benzênico que pode estar esterificado, encontrando-se, de forma natural, tanto os livres quanto os esterificados (PEREDA et al., 2005).

Atualmente, está vitamina (vit. E) é um termo genérico para todos os seus tocoferóis e derivados, tendo a atividade biológica o α - tocoferol (TRABER e PACKER, 1995; TRABER e SIES, 1996). Na natureza, oito substâncias foram encontradas com atividades da vitamina E: - α -, - β -, γ - e Δ - tocoferol; e α -, - β -, γ - e δ - tocotrienol (Figura 3). Está localizada na interface aquosa e nos domínios hidrofílicos das membranas biológicas e lipoproteínas (QUINN, 2004), e protege as membranas celulares através de dois mecanismos: como agente antioxidante e formando complexos com os fosfolipídios, estabilizando as membranas através de ligações de “Van der Waals” (BRADFORD et al., 2003). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a vitamina E atua como captador de radicais livres e reparador de membranas (MACHLIN, 1984). Todavia, atua também diminuindo a peroxidação lipídica através da manutenção das concentrações de superóxido dismutase (BECONI et al., 1991).

A vitamina E tem importante papel reprodutivo e sua deficiência causa degeneração testicular em cães (DIPLOCK, 1974), inibição da espermatogênese (MACHLIN, 1984) e aumento da oxidação lipídica dos espermatozoides de carneiros (JONES e MANN, 1977). Além destes efeitos em animais, esta vitamina possui duas funções importantes na célula. A primeira consiste em sua ação antioxidante, evitando danos aos tecidos compostos por lipídios insaturados, através da remoção de radicais de oxigênio ativo (MUKAI, 1993), bem como oxigênio singlet (FUKUZAWA et al., 1997). A segunda função é estabilizar a estrutura das membranas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

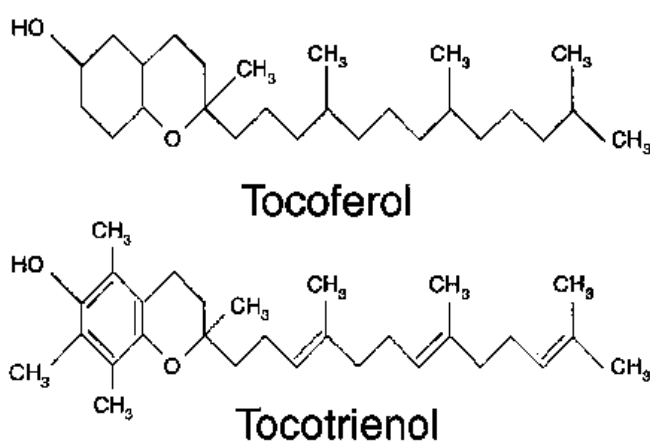


Figura 3 – Fórmula estrutural do Tocoferol e Tocotrienol.

(Fonte: FAO, 2007).

2.7 Influência dos antioxidantes na fertilidade masculina

Os espermatozoides são susceptíveis a danos peroxidativos por apresentarem em suas membranas grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (POULOS et al., 1973). Os danos peroxidativos induzem à formação de ROS, uma das maiores causas de redução da viabilidade e fertilidade dos espermatozoides (HSU et al., 1998). Dawson et al. (1992) observaram melhora na viabilidade de espermatozoides, diminuição na porcentagem de anormalidades e aumento na motilidade espermática após suplementação com vitamina C em homens fumantes com 25 anos de idade. Luck et al. (1995) descreveram que o ascorbato pode ser considerado essencial para o processo reprodutivo humano.

Yousef et al. (2003) demonstraram, em coelhos machos, que a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) foi significativamente diminuída após a suplementação com ácido ascórbico (vit. C) e α -tocoferol (vit. E). Resultados semelhantes

foram encontrados em caprinos (BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al., 1995) e humanos (GEVA et al., 1996), onde a suplementação com vitamina E e/ou vitamina C reduziu as ROS, melhorando a taxa de fertilização por diminuir a peroxidação lipídica. Fraga et al. (1992) demonstraram que o ácido ascórbico está presente em concentrações mais elevadas no plasma seminal humano do que no plasma sanguíneo (400 vs 60 μ M), presumivelmente refletindo o seu importante papel fisiológico. Além disso, segundo estes autores, o ácido ascórbico é uma das defesas efetivas contra a peroxidação lipídica no plasma seminal, atuando na prevenção de danos oxidativos ao DNA, que resulta em infertilidade e defeitos congênitos nos produtos nascidos.

Sarlós et al. (2002), trabalhando com sêmen de carneiros, avaliaram o efeito da adição de vários antioxidantes como a glutathione peroxidase, onde observaram que esta substância prolonga o período de conservação do sêmen e melhora a motilidade dos espermatozóides.

A Glutathione-S-Transferase (GST) está presente em quantidade considerável na maioria dos plasmas seminais de homens férteis, apresentando quatro principais classes: alfa (A), mu (M), pi (P) e theta (T), envolvidas na detoxificação de muitos compostos eletrofílicos pela conjugação de reações com a glutathione. Foi demonstrado que a glutathione e a glutathione-S-transferase teriam papel importante na reprodução, por melhorar a motilidade espermática e a morfologia dos espermatozóides, apesar das pesquisas no plasma seminal serem limitadas (RAIJMAKERS e MAARTEN, 2003).

Outro elemento implicado na degradação dos peróxidos de hidrogênio é o selênio (ALVAREZ e STOREY, 1989), conhecido co-fator da glutathione peroxidase (GSHPx), uma das enzimas que catalisa a degradação dos peróxidos (WHANGER e BUTLER, 1988). A atividade da GPx é encontrada no sêmen de várias espécies, como coelhos e caprinos, com diferentes funções de proteção na degradação de hidroperóxidos (VIRÁG e MÉZES, 1994; MARIN-GUZMAN et al., 1997).

3 REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, Y.P.; VANHA-PERTTULA, T. Glutathione, L-glutamic acid and gamma-glutamyl transpeptidase in the bull reproductive tissues. **International Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 11, p. 123–131, 1988.
- AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LOUGHLIN, K.R. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. **Journal of Urology**, Baltimore, v. 152, p. 107-110, 1994.
- AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 25, p. 191-194, 2002.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, Cambridge, v. 81, p. 459-469, 1987.
- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; WEST, K. et al. Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the high levels of reactive oxygen species recorded in the ejaculates of oligozoospermic patients. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 94, p. 451-462, 1992.
- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D.W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 35, p. 302-315, 1993.
- AITKEN, R.J.; PATERSON, M.; FISHER, H. et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, London, v. 108, p. 2017-2025, 1995.
- ALVAREZ, C.A.; MORAES, G.V. Efeitos da Selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. Artigo de Revisão. **Sábios: Revista Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 1, p. 42-51, 2006.
- 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**, New York, v. 23, p. 77–90, 1989.
- ALVAREZ, J.G.; TOUCHSTONE, J.C.; BLASCO, L. et al. 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**, Lawrence, v. 8, p. 338-348, 1987.

- ANDERSEN, K. Insemination with frozen semen based on a new insemination technique. **Zuchthygiene**, Berlin, v. 10, n. 1, p. 1-4, 1975.
- BECONI, M.T.; AFFRANCHINO, M.A.; SCHANG, L.M. et al. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, Marrickville, v. 23, p. 545-553, 1991.
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C. et al. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 56, p. 275-286, 2001.
- BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A.H. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. **Journal Applied Physiology**, Bethesda, v. 29, p. 245-263, 2004.
- BOUCHARD, G.F.; MORRIS, J.K.; SIKES, J.D. Effect of storage temperatures, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. **Theriogenology**, Stoneham, v. 34, n. 1, p. 147-157, 1990.
- BRADFORD, A.; ATKINSON, J.; FULLER, N. et al. The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 44, n. 10, p. 1940-1945, 2003.
- BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B.; PIETRAS, B. et al. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 47, p. 69-74, 1995.
- BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. et al. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. I – efeito do meio diluidor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, p. 364-371, 2001.
- CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A. et al. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2002.
- CHIRINÉA, V.H. **Efeito do meio de congelção sobre as características morfofuncionais do sêmen canino**. 2004. 65p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- CHIRINÉA, V.H.; MARTINS, M.I.M; SOUZA, F.F. et al. Efeito da suplementação de diferentes açúcares no meio de congelção de sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 27, n. 3, p. 361-363, 2003.
- CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R. W. (ed), **Current Veterinary Therapy-small Animal Practice**. Philadelphia: W.B.Saunders, p. 1247-1258, 1989.

- COOPER, C.E.; VOLLAARD, N.B.; CHOUEIRI, T. et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochemical Society Transaction**, London, v. 30, p. 280-285, 2002.
- CUNHA, I.C.N. **Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicina-gema**. 1997. 124p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- CUNHA, I.C.N. **Criopreservação do sêmen de cães**. 2002. 149p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.
- DAWSON, E.B.; HARRIS, W.A.; TETER, M.C. et al. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality smokers. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 58, p. 1034–1039, 1992.
- De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 13, p. 368, 1992a.
- De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate (ATP) plays an important role in inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 13, p. 379-386, 1992b.
- De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, Oxford, n. 1, v. 10, p. 15-21, 1995.
- DENEKE, S.M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal Physiology**, Baltimore, v. 257, p. 163-173, 1989.
- DIPLOCK, A.T. The nutritional and metabolic roles of selenium and vitamin E. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 33, n. 3, p. 315-322, 1974.
- DRÖGE, W.; MIHM, S.; BOCKSTETTE, M. et al. Effect of reactive oxygen intermediates and antioxidants on proliferation and function of T lymphocytes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 234, p. 135–151, 1994.
- EATON, J.W. – Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. **Journal Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 118, p. 3-4, 1991.
- EICHNER, E.R. Physical activity and free radicals. In: BOUCHARD, C. (Ed), PHYSICAL ACTIVITY, FITNESS AND HEALTH. **Human Kinetics**. Champaign, p. 35-42, 1994.

- ENGLAND, G.C.W. Criopreservatin of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Oxford, v. 47, p. 243-255, 1993.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Capítulo 2 - **Composición de las grasas alimentarias**. 2008. Disponível em www.fao.org/docrep/v4700s/v4700s06.htm. Acesso em 19 jan 2008.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionada, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FOOTE, R.H. The influence of frequency of semen collection, fractionation, of the ejaculate, and dilution rate of the survival of stored dog semen. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 54, p. 89-97, 1964.
- FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 88, p. 11003-11006, 1992.
- FUKUZAWA, K.; MATSUURA, K.; TOKUMURA, A. et al. Kinetics and Dynamics of Singlet Oxygen Scavenging by α -Tocopherol in Phospholipid Model Membranes. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 22, p. 923-930, 1997.
- FROMAN, D.P.; ARMANN, R.P.; RIEK, P.M.; OLAR, T.T. Acrosin activity of canine spermatozoa as an index of cellular damage. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 70, p. 301-308, Fort Collins, 1984.
- GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1271, n. 2-3, p. 321-326, 1995.
- GEVA, E.; BARTOOV, B.; ZABLUDOVSKY, N. et al. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an *in vitro* fertilization program. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 66, p. 430-434, 1996.
- GILL, H.P.; KAUFMAN, C.F.; FOOTE, R.H. et al. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid - stored, and frozen - stored semen. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 31, p. 1807-1813, 1970.
- GOMES, E.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relashinships with sêmen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 21, p. 81-94, 1998.

- HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **Federation of American Societies for Experimental Biology – FASEB Journal**, v. 1, p. 358-364, 1987.
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 2ed. Oxford: University Press, p. 543, 1989.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, New York, v. 91, p. 14-22, 1991.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed. New York:Oxford University Press. 936p, 1999.
- HARROP, A.E. Semen preservation and artificial insemination. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 4, The Hauge, 1961. **Proceedings...** p. 898-901, 1961.
- HATAMOTO, L.K. **Efeito do estresse e da suplementação oral com vitamina E sobre parâmetros seminais, peroxidação lipídica de componentes seminais e a atividade das enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal de cães**. 2004. 181p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, São Paulo.
- HSU, P.C.; LIU, M.Y.; HSU, C.C. et al. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicology**, Limerick, v. 128, p. 169-179, 1998.
- IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 57, p. 409-416, 1992.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 10, p. 156-65, 1994.
- JONES, R.; MANN, T. Damage to spermatozoa by peroxidation endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 50, n. 2, p. 261-268, 1977.
- KESSOPOULOS, E.; TOMLINSON, M.J.; BARRATT, C.L.R. et al. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 94, p. 463-470, 1994.
- KIDD, P.M. Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage. **Alternative Medicine Review**, Canadá, v. 2, n. 3, p. 155-176, 1997.
- KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R.M.J. et al. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Canadá, v. 86, p. 5159-5162, jul. 1989.

- LINDE-FORSBERG, C.; STRÖM HOLST, B.; GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozenthawed dog semen: a retrospective study. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 11-23, 1999.
- LUCK, M.R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLLES, R.A. Minireview: ascorbic acid and fertility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 52, p. 262-266, 1995.
- MACHLIN, L.J. In Vitamin E Handbook of vitamins: nutritional, biochemical, and clinical aspects. **Marcel Dekker**, New York, p. 99-145, 1984.
- MAHI, C.A.; YANAGIMACHI, R. Capacitation, acrossome reaction and egg penetration by canine spermatozoa in a simple define medium. **Gamete Research**, New York, v. 1, p. 101-109, 1978.
- MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; CHUNG, Y.K. Effect of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue response, semen quality and subsequent fertilization rates in mature gilts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p. 2994-3003, 1997.
- MAZZILLI, F.; ROSSI, T.; MARCHESINI, M. et al. Superoxide anion in human sêmen related to seminal parameters and clinical aspects. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 62, p. 862-868, 1994.
- MESSIAS, C. **Algumas características do sêmen do cão após diluição e resfriamento**. 2000. 61p. Universidade Federal do Paraná. Tese de Mestrado, Paraná.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial, inseminação artificial nos cães**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 750p. 1987.
- MORTON, D.B.; BRUCE, S.G. Semen evaluation, cryopreservation and fators relevant to the use of frozen semen in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 39, p. 311-316, 1989.
- MUKAI, K. Synthesis and Kinetc Study of Antioxidant and Prooxidant Actions of Vitamin E Derivativos in: PACKER, L. FUCHS, J. **Vitamin E in health and disease**. New York: Marcel editors. Dekker, p. 97-119, 1993.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system free radical. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
- OETTLÉ, E.E. Changes in acrossome morfology during cooling and freezing of dog semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdan, v. 12, p. 145-150, 1986.
- PASQUALOTTO, F.F.; SHARMA, R.K.; NELSON, D.R. et al. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 73, n. 3, p. 459-464, mar 2000.

- PEREDA, J.A.O.; RODRIGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F. et al. **Tecnología de alimentos**. Porto Alegre: Artmed Editora, 294 p. 2005.
- PERÓN, J.M.R.; LÓPEZ, J.R.M.; LÓPEZ, Y.T. Radicales libres em la biomedicina y estrés oxidativo. **Revista Cubana de Medicina Militar**, Habana, v. 30, n. 1, p. 36-44, 2001.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKERS, A.S. A revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**, London, v. 164, p. 164-166, 1949.
- POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 46, p. 541-549, 1973.
- QUINN, P.J. Is the distribution of α -tocopherol in membranes consistent with its putative functions?. **Biochemistry**, New York, v. 69, n. 1, p. 58-66, 2004.
- RAIJMAKERS, M.; MAARTEN, T.M. Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 79, n. 1, p. 169-172, 2003.
- RHEMREV, J.P.T.; VERMEIDEN, J.P.W.; HAENEN, G.R.M.M. et al. Progressively motile human spermatozoa are well protected against *in vitro* lipid peroxidation imposed by induced oxidative stress. **Andrologia**, Berlin, v. 33, p. 151-158, 2001.
- ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. et al. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without EQUEx STM paste. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, p. 1045-1058, 1999.
- ROWSON, L.E.A. Infertility of cow, sow and bitch. **Ireland of Veterinary Journal**, Dublin, v. 8, p. 216- 221, 1954.
- SAACKE, R.G.; WHITE, J.M. Semen quality tests and their relationship to fertility. **Proceedings of the 4th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, National Association of Animal Breeders**, Chicago, p. 22-27. 1972.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.
- SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M. et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 50, n. 2, p. 235-245, 2002.
- SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. **Artificial Insemination Digest**, Columbia, v. 12, p. 6, 1969.
- SEN, C. K.; KHANNA, S.; ROY, S. Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols. **Life Science**, Elmsford, New York, v. 78, n. 18, p. 2088-2098, 2006.

- SENGOKU, K.; TAMATE, K.; YOSHIDA, T. et al. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 69, n. 3, p. 522-527, 1998.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 91 (suppl 3C), p. 31S-38S, 1991.
- SIKKA, S.C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.J. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 16, p. 464-481, 1995.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.; SILVA, L.D.M. Criopreservação do sêmen canino: Revisão. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 11, n. 2, p. 119-129, 2001.
- SINCLAIR, S. Male infertility: nutritional and environmental considerations. **Alternative Medicine Review**, Canadá, v. 5, p. 28-38, 2000.
- SOUZA, J.A.T.; SPICCIATI, W.; VISINTI, J.A. et al. Características seminais de cães da raça Pastor Alemão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 181-186, 1995.
- STRYER, L. **Bioquímica**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1000p. 1996.
- TRABER, M.G.; PACKER, L. Vitamin E: beyond antioxidant function. **American Journal of Clinical Nutrition**. New York, v. 62 (6 Suppl), p. 1501S-1509S, 1995.
- TRABER, M.G.; SIES, H. Vitamin E in humans: demand and delivery. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, California, v. 16, p. 321-347, 1996.
- TURRENS, J. Fuentes intracelulares de especies oxidants em condiciones normales y patológicas. **Antioxidantes y Calidad de Vida**, Buenos Aires, v. 1, p. 16-19, 1994.
- VIRÁG, G.Y.; MÉZES, M. Glutathioneperoxidase activity of seminal plasma in rabbits. **Magyar Allatorvosok Lapja**, Budapest, v. 49, p. 296-297, 1994.
- WALES, R.G.; WHITE, I.G. Viability of diluted dog spermatozoa in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 5, p. 67-76, 1963.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved sêmen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-1, p. 481-492, 2000.
- WHANGER, P.D.; BUTLER, J.A. Effects of various dietary levels of selenium as selenite or selenomethionine on tissue selenium levels and glutathione peroxidase activity in rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 118, p. 846-852, 1988.

- WOLFF, H. The biological significance of white blood in sêmen. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 63, p. 1143-1157, 1995.
- XIANG, C.; OLIVER, D.J. Glutathione metabolic genes coodinately to respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 10, p. 1539-1550, 1998.
- YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**, Cambridge, Engeland, v. 2, n. 4, p. 371-372, 1994.
- YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effects of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 76, p. 99-111, 2003.
- 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**, Copenhagen, v. 16, n. 3, p. 183-188, 1993.

4 EXPERIMENTO

4.1 EFEITO DA ADIÇÃO DE TROLOX E GLUTATIONA REDUZIDA NA VIABILIDADE *in vitro* DE ESPERMATOZÓIDES DE CÃES*

PAULO CÉSAR VASCO DE ALBUQUERQUE PEIXOTO¹, ZORAIDE FERNANDES
COLETO², CRISTIANE SCAVUZZI MOURA², FELIPE COSTA ALMEIDA³
PIERRE CASTRO SOARES⁴ E MARIA MADALENA PESSOA GUERRA⁵

* Trabalho extraído da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentado ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

¹Médico Veterinário Autônomo, Mestre

²Médica Veterinária Autônoma, Doutora

³Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, estudante de graduação

⁴Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, professor adjunto

⁵Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, professor associado

RESUMO

Com o objetivo avaliar o efeito da adição dos antioxidantes Trolox e Glutathione reduzida (GSH) na viabilidade *in vitro* de espermatozóides criopreservados de cães, amostras de sêmen foram colhidas de animais das raças Buldogue Francês (n=1), Basset Hound (n=2) e Rottweiler (n=1), através de manipulação digital. A seguir, procedeu-se à avaliação macroscópica e microscópica, e divisão do volume de sêmen em alíquotas, de acordo com os experimentos e grupos experimentais, utilizando diferentes concentrações de Trolox (200 e 300 µM/L) ou GSH (2 e 5 µM/L). As amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL), criopreservadas em máquina de congelamento e armazenadas em nitrogênio líquido. Após descongelamento a 37 °C (60 seg) e incubação durante 60 minutos, constatou-se que os resultados de motilidade, vigor e espermatozóides com acrosomas íntegros evidenciaram diferença significativa (P<0,05) apenas entre os tempos de incubação, nos três experimentos. No Exp. 2, a adição de 2 e 5 µM/L de GSH (G2 e G3) determinou maior (P<0,05) percentual de células sem estresse oxidativo. Conclui-se que GSH, nas concentrações de 2 e 5 µM/L, pode ser adicionada ao diluente de criopreservação do sêmen de cães.

PALAVRAS-CHAVES: Criopreservação, viabilidade, sêmen, antioxidante, cães.

ABSTRACT

**EFFECT OF TROLOX AND GLUTATHIONE REDUCED (GSH) ADDITION
ON THE *in vitro* VIABILITY OF DOG CRYOPRESERVED SPERM**

In order to evaluate the effect of adding Trolox and Glutathione reduced antioxidants on the *in vitro* viability of dog cryopreserved sperm, semen samples were harvested from animals of the French Bulldog (n=1), Basset Hound (n=2) e Rottweiler (n=1) breeds, through digital manipulation. After macroscopic and microscopic evaluation, the volume of semen was divided on aliquots, according to the experiments and experimental groups, using different concentrations of Trolox (200 and 300 $\mu\text{M/L}$) or GSH (2 and 5 $\mu\text{M/L}$). The samples were packaged in straws (0.25 mL), cryopreserved in freezing machine and stored in liquid nitrogen. After thawing at 37 °C (60 sec) and incubation during 60 minutes, it was detected that motility, vigor and sperm with intact acrosomes had significant difference ($P<0.05$) only among incubation times, on the three experiments. In the Exp. 2, the addition of 2 and 5 $\mu\text{M/L}$ of GSH (G2 and G3) determined higher ($P<0.05$) percentage of sperm without oxidative stress. So, it can be concluded that GSH, on the concentration of 2 and 5 $\mu\text{M/L}$, can be added to diluent of dog semen cryopreservation.

KEY WORDS: Cryopreservation, viability, semen, antioxidant, dog.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen possibilita melhor aproveitamento dos ejaculados de um reprodutor, assim como a difusão deste material genético (SILVA et al., 2001). No entanto, este procedimento reduz a fertilidade dos espermatozóides devido a lesões estruturais e funcionais advindas de estresse térmico (MORTON & BRUCE, 1989; JASKO, 1994), osmótico e oxidativo (WATSON, 2000; BALL & VO, 2001), decorrentes da redução de temperatura, armazenamento, descongelação (MEDEIROS et al., 2002) e toxicidade dos crioprotetores (WATSON, 2000; BALL & VO, 2001).

Ressalta-se, todavia, que os efeitos da criopreservação na fisiologia espermática são semelhantes àqueles observados após o processo de capacitação (WATSON, 2000), determinando aumento da permeabilidade da membrana e da produção de espécies reativas ao

oxigênio (ROS), resultando em danos peroxidativos, uma das principais causas da redução da viabilidade e da fertilidade dos espermatozóides (HSU et al., 1998). Em todos os organismos aeróbicos, as ROS são formadas e degradadas em concentrações fisiológicas normais para a realização das funções celulares, mas, em quantidades excessivas, determinam estresse oxidativo. O aumento da produção intracelular de ROS ameaça a integridade das diversas biomoléculas, incluindo proteínas (STADTMAN & LEVINE, 2000), lipídios (YLÄHERTTUALA, 1999) e DNA (MATÉS et al., 1999; MARNETT, 2000).

O uso de antioxidantes para neutralizar os efeitos da ação das ROS pode melhorar a motilidade e a viabilidade dos espermatozóides criopreservados. Desta forma, a adição destas substâncias aos meios diluidores de congelação tem sido testada com a finalidade de reduzir os danos celulares provocados pelo estresse oxidativo (MICHAEL et al., 2007). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a Glutathiona reduzida (GSH) é o principal constituinte do sistema antioxidante de defesa e está envolvida no mecanismo de proteção celular, através da remoção de ROS, incluindo os peróxidos formados no metabolismo do oxigênio. Este efeito deve-se ao fato da GSH apresentar uma potente capacidade em doar elétrons (DRÖGE et al., 1994). A vitamina E, por sua vez, atua como captador de ROS e reparador de membranas (MACHLIN, 1984), interferindo na peroxidação lipídica catalisada *in vitro* pelo íon ferroso e, conseqüentemente, preservando a capacidade de fusão dos espermatozóides aos ovócitos (AITKEN & CLARKSON, 1988).

No sêmen de canídeos, a criopreservação é uma técnica muito estudada, porém existem ainda algumas pesquisas a ser realizadas para padronização desta metodologia, devido principalmente às particularidades inerentes a esta espécie. Desta forma, diferentes meios diluidores têm sido testados visando obter aquele que melhor preserve a viabilidade pós-descongelação dos espermatozóides de cães (CHRISTIANSEN, 1986). Por conseguinte, considerando os danos espermáticos causados pelo processo de congelação, como conseqüência do aumento da produção de ROS e da permeabilidade de membrana, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da adição dos antioxidantes Trolox e Glutathiona reduzida na viabilidade *in vitro* de espermatozóides criopreservados de cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados quatro cães adultos, com idade variando de 2 a 5 anos e fertilidade comprovada, pertencentes ao canil Brave Basset localizado no Município de Camaragibe (PE). Nos experimentos 1 e 3, utilizou-se animais das raças Buldogue Francês (n=1), Basset

Hound (n=2) e Rottweiler (n=1), enquanto no experimento 2 foram utilizados animais das raças Buldogue Francês (n=1) e Basset Hound (n=2). Todos os animais foram submetidos às mesmas condições de manejo sanitário, e alimentados com ração comercial uma vez ao dia, de acordo com o peso corporal (10g/Kg de PV), além de ser fornecido água *ad libitum*.

Em cada experimento, foram colhidos quatro ejaculados/animal através da técnica da manipulação digital (CHRISTIANSEN, 1986), totalizando 44 amostras de sêmen, as quais foram acondicionadas em tubos de ensaio e mantidas em banho-maria (37 °C) durante o procedimento de avaliação macroscópica (volume, cor e aspecto) e microscópica (motilidade progressiva, vigor, concentração, integridade de acrossoma e de DNA, e estresse oxidativo).

Os parâmetros macroscópicos foram aferidos diretamente nos tubos de ensaio. Para análise da motilidade progressiva (0-100%) e do vigor espermático (0-5) de cada ejaculado, foi depositada uma alíquota (10 µL) de sêmen sobre lâmina previamente aquecida a 37 °C e conduzida ao microscópio óptico (Quimis®, Diadema, São Paulo), sendo aprovadas as amostras que apresentaram motilidade progressiva $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 (CBRA, 1996). A concentração espermática foi obtida em Câmara de Neubauer de acordo com a técnica descrita por Mies Filho (1987), e o resultado expresso em milhões de espermatozóides/mL de sêmen.

A avaliação da integridade do acrossoma foi realizada através da técnica de coloração FITC-conjugada ao *Peanut* aglutinina (FITC-PNA; ROTH et al., 1998). Inicialmente, alíquotas de 10 µL de sêmen foram utilizadas na preparação de esfregaços e armazenadas (4 °C) protegidas da luz até o momento da avaliação. No prazo máximo de até duas semanas, as lâminas foram coradas com FITC-PNA (Sigma, Saint Louis, MO, USA), acondicionadas em caixa de isopor durante 20 minutos a 4 °C, e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Tóquio, Japão) utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm), onde foram contados 200 espermatozóides/lâmina e classificados em: a) acrossomas íntactos (AI), quando apresentava a região acrossomal corada em verde; b) acrossomas reagidos (AR), quando apresentavam a região acrossomal com coloração verde mesclada; sem coloração ou apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática.

A integridade de DNA foi avaliada através da técnica de Laranja de Acridina (EVENSON et al., 1999), onde uma alíquota (10µL) de sêmen foi diluída em 990µL de solução TNE (Tris.HCl 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA.Na₂.2H₂O a 1mM, q.s.p. 100mL; pH 7,4), em tubos de microcentrífuga (1 milhão de células/mL), criopreservadas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C). No momento da análise, as

amostras foram descongeladas a 37 °C e, a seguir, adicionou-se 200µL de solução TNE em tubos de microcentrífuga imersos em gelo. Imediatamente após, foram adicionados 400µL de solução detergente (0,1mL de Triton X-100, 0,877g de NaCl, 8,0mL de HCl 1N; pH 1,4). Após 30 segundos, adicionou-se 600µL da solução de Laranja de Acridina (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) tamponada (ácido cítrico 0,1M, fosfato de sódio 0,2M, NaCl 0,15M, EDTA 1mM; pH 6,0). Em seguida, alíquotas (5µL) dessa solução foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Tokio, Japão) utilizando o filtro de fluoresceína (450-490nm, espelho dicromático de 510nm). Um total de 200 espermatozóides/lâmina foi avaliado e classificado como: a) Espermatozóides com fluorescência vermelha apresentavam estruturas de cromatina anormal, e b) Espermatozóides com fluorescência verde apresentavam estruturas de cromatina normal.

Utilizou-se a análise da ocorrência de estresse oxidativo através da técnica descrita por SALEH & AGARWAL (2002). Alíquotas (10 µL) de sêmen foram submetidas ao teste de Nitroblue Tetrazolium (NBT), onde inicialmente as amostras foram diluídas (1:1; v:v) em solução de 10% de NBT (Sigma, Saint Louis, MO, USA), e incubadas durante 30 minutos à temperatura de 37 °C. A seguir, as amostras acondicionadas em tubos de ensaio permaneceram durante 30 minutos em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 250G (durante 5 minutos). Imediatamente após, foram preparados esfregaços do *pellet* das amostras, os quais foram submetidos à secagem em temperatura ambiente. Após secagem, foram contados 100 espermatozóides/lâmina, em microscópio de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão; 100X), os quais foram avaliados da seguinte forma: 1) espermatozóide com estresse oxidativo, quando apresentava depósito de formazana na cabeça ou na peça intermediária; 2) espermatozóide sem estresse oxidativo, quando nenhum depósito de formazana foi observado na célula espermática.

Após colheita e análise dos ejaculados, as amostras aprovadas foram divididas em alíquotas iguais, de acordo com o experimento. Ao diluidor Tris-gema (3,28g de Tris-hidroximetilaminometano; 1,78g de ácido cítrico; 1,25g de frutose; 20% de gema de ovo; 100 mL de água destilada; pH 6,8), utilizado por RODRIGUES (1997) e modificado por COLETO (2006), foram adicionados 6% de glicerol, além de antioxidantes de acordo com o experimento e o grupo experimental, de maneira que cada grupo foi criopreservado em quadruplicata, seguindo a ordem aleatória de criopreservação. Experimento 1: G1) sem antioxidantes (Grupo Controle); G2) 200 µM/L de Trolox (Sigma, Saint Louis, MO, USA); e G3) 300 µM/L de Trolox. Experimento 2: G1) sem antioxidantes (Grupo controle); G2) 2

$\mu\text{M/L}$ de GSH (Sigma, Saint Louis, MO, USA); e G3) 5 $\mu\text{M/L}$ de GSH. No Experimento 3 foram utilizadas as concentrações de Trolox e GSH que apesentaram melhor resultado nos Exp. 1 e 2, correspondendo a: G1) sem antioxidantes (Grupo Controle); G2) 200 μM de Trolox (Sigma, Saint Louis, MO, USA); G3) 2 μM de GSH (Sigma, Saint Louis, MO, USA); e G4) 200 μM de Trolox + 2 μM de GSH.

As amostras de sêmen diluídas foram envasadas em palhetas (0,25 mL) e processadas em máquina de congelação de sêmen (modelo TK 3000; TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, MG, Brasil), utilizando a curva de $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, e a $-12,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$. A seguir, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Uma semana após o procedimento de criopreservação, as amostras foram descongeladas à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 segundos, e avaliadas quanto a motilidade progressiva, vigor, integridade do acrossoma (Experimentos 1, 2 e 3), integridade do DNA (Experimentos 1 e 2) e ocorrência de estresse oxidativo (Experimento 2), conforme as técnicas descritas anteriormente.

Com o intuito de estudar o efeito do tempo de incubação pós-descongelação, sobre a viabilidade dos espermatozóides criopreservados de cães, em diluidor à base de Tris-gema suplementado com antioxidantes (Trolox ou Glutathione reduzida), as amostras descongeladas foram avaliadas pelo teste de Termo-resistência (TTR), onde se observou a motilidade progressiva e o vigor espermático após 0, 30 e 60 min de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa GLM do SAS (SAS, 1996). Na presença de efeito em relação aos fatores de variação, a comparação entre as médias foi realizada pela técnica da diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de Tukey. Para o estudo da relação entre pares de variáveis, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância de 5% foi utilizado para todos os testes.

RESULTADOS

Experimento 1

As amostras de sêmen *in natura* apresentaram coloração branca e aparência leitosa. As médias e desvio padrão dos parâmetros analisados evidenciaram $2,71 \pm 0,54\text{ mL}$ de volume das frações ricas em espermatozóides, $207,81 \pm 28,24 \times 10^6$ espermatozóides/mL de concentração

espermática, $89,69 \pm 4,40\%$ de motilidade progressiva, $4,56 \pm 0,48$ de vigor, $95,75 \pm 3,30\%$ de espermatozoides com acrossomas intactos, e 100% de células com DNA íntegros.

Após descongelamento, as células espermáticas criopreservadas em Tris-Gema, acrescido de diferentes concentrações de Trolox, não evidenciaram diferença significativa ($P > 0,05$) na motilidade progressiva (Figuras 1a) e no vigor espermático (Figuras 1b), entre os grupos experimentais, durante o TTR. Todavia, evidenciou-se redução significativa ($P < 0,05$) no porcentual de células móveis (Figura 1a), em função do tempo de incubação, até os 45 minutos de avaliação. Em contrapartida, observou-se que o vigor das células espermáticas (Figuras 1b) apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) apenas dos 15 aos 45 minutos do teste TTR.

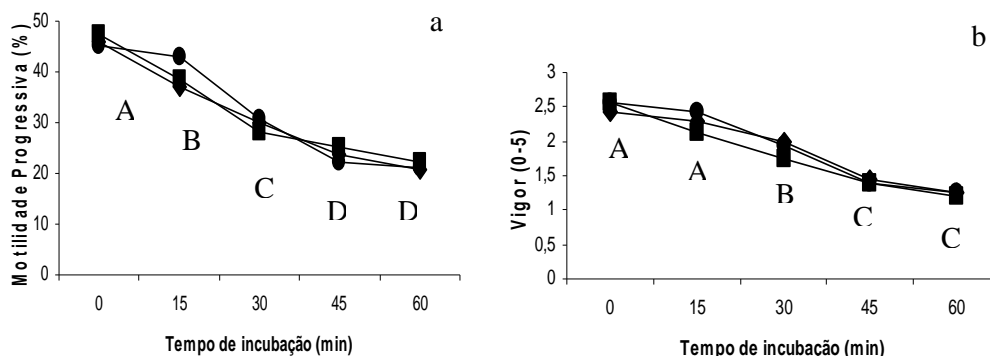


FIGURA 1. Motilidade progressiva (a) e vigor espermático (b) em amostras de sêmen de cães submetidas à congelamento em Tris-gema acrescido de diferentes concentrações de Trolox (G1= 0 μM/L, ●; G2=200 μM/L, ◆; G3) 300 μM/L, ■), durante o teste de termo-resistência a 37 °C. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significante ($P < 0,05$) entre tempos de incubação.

Com relação aos percentuais de espermatozoides com acrossoma íntegros, verificou-se não haver diferença entre as médias obtidas após o descongelamento ($P > 0,9320$), sendo 22,95% para as amostras do grupo controle (G1); 24,95% para as amostras criopreservadas com 200 μM de Trolox (G2) e 23,74% para as amostras criopreservadas com 300 μM de Trolox (G3). Na avaliação da correlação de Pearson (Tabela 1) observou-se correlação significativa entre acrossoma e motilidade progressiva ($P = 0,0421$), assim como entre motilidade progressiva e vigor espermático ($P = 0,0001$), em todas as amostras de sêmen criopreservadas, independente da adição de Trolox ao diluente Tris-gema.

TABELA 1. Matriz de correlação de Pearson (r) e respectivos níveis de significância entre pares de variáveis de amostras de sêmen de cães sem e com adição de Trolox

	Acrossoma	MP	Vigor
Acrossoma	1	-0,30 (0,0421)	-0,15 (0,3270)
MP		1	0,54 (0,0001)
Vigor			1

MP= Motilidade Progressiva.

Experimento 2

As amostras de sêmen *in natura* apresentaram-se de coloração branca e aparência leitosa. As médias e desvio padrão do volume das frações ricas em espermatozóides, da concentração espermática, da motilidade progressiva, do vigor, do percentual de células com acrossomas íntegros, de células com estresse oxidativo e de células com DNA íntegros, foi de $1,92 \pm 0,36$ mL; $127,71 \pm 20,93 \times 10^6$ espermatozóide/mL; $93,33 \pm 5,00\%$; $5,00 \pm 0,00$; $69,64 \pm 6,98\%$; $42,17 \pm 2,94\%$ e 100,00%, respectivamente.

Durante o período de incubação de 60 min a 37 °C (TTR) observou-se diferenças significantes ($P < 0,05$) nos valores de motilidade progressiva (Figura 2a) e vigor espermático (Figura 2b). Entretanto, ao se avaliar o efeito da adição de antioxidantes, não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais, em cada momento de avaliação, nesses dois parâmetros estudados (Figuras 2a e 2b).

A análise da integridade do acrossoma das células espermáticas (Tabela 2), não evidenciou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos. Em contrapartida, o percentual de espermatozóides sem estresse oxidativo (Tabela 2) diferiu significativamente ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais, onde se constatou que as amostras de sêmen suplementadas com 2 e 5 μ M de GSH (G2 e G3, respectivamente) foram superiores àquelas do Grupo Controle (G1). Além disso, constatou-se que 100,00% dos espermatozóides apresentaram DNA íntegros, em todos os grupos experimentais (G1, G2 e G3).

Na avaliação da correlação de Pearson (Tabela 3) observou-se correlação significativa apenas entre motilidade progressiva e acrossomas íntegros ($P = 0,0467$), em todas as amostras de sêmen criopreservadas, independente da adição de GSH ao diluente Tris-gema.

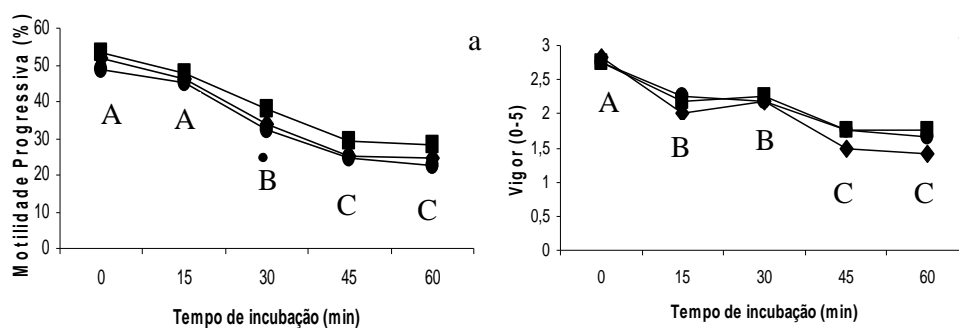


FIGURA 2. Motilidade progressiva (a) e vigor espermático (b) em amostras de sêmen de cães congeladas com Tris-gema acrescido de diferentes concentrações de GSH (G1= 0μM/L, ● ; G2=2 μM/L, ◆; G3) 5 μM/L, ■), durante o teste de termo-resistência a 37 °C. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa (P<0,05) entre tempos de incubação.

TABELA 2. Média e desvio padrão do porcentual de espermatozoides de cães com acrossomas íntegros, sem estresse oxidativo e com DNA íntegros, após criopreservação com diluidor à base de Tris-gema suplementado com diferentes concentrações de Glutathione Reduzida (GSH), durante o teste de termo-resistência 37 °C

Grupos	Variáveis		
	Acrossomas íntegros	Estresse oxidativo	DNA íntegros
G1	50,63±14,81	12,87±1,22b	100,00
G2	47,66±12,87	17,16±1,47a	100,00
G3	47,22±10,31	17,73±1,65a	100,00

G1= 0 μM/L; G2=2 μM/L; G3) 5 μM/L de Glutathione reduzida. Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,01) entre grupos experimentais.

TABELA 3. Matriz de correlação de Pearson (r) e respectivos níveis de significância (P) entre pares de variáveis do sêmen de cães sem e com adição de GSH

	MP	Vigor	Acrossoma	Estresse Oxidativo
MP	1	0,12 (0,5130)	-0,33 (0,0467)	0,21 (0,2219)
Vigor		1	0,05 (0,7861)	0,11 (0,5266)
Acrossoma			1	-0,03 (0,8529)
Estresse				1

MP = Motilidade Progressiva.

Experimento 3

A avaliação macroscópica das amostras de sêmen *in natura* evidenciou coloração branca e aspecto leitoso. O volume médio das frações ricas em espermatozóides foi de $2,21 \pm 0,54$ mL, com concentração espermática média de $164,06 \pm 28,25 \times 10^6$ espermatozóide/mL. A motilidade progressiva apresentou média de $89,69 \pm 4,40\%$. O vigor apresentou média de $4,56 \pm 0,48$, e o percentual médio de espermatozóides com acrossomas íntegros foi de $91,75 \pm 4,57\%$.

Os resultados da avaliação das células espermáticas criopreservadas em Tris-Gema acrescidas de Trolox, GSH ou a associação de Trolox + GSH (Figura 3), demonstraram que durante todo o período de incubação a 37 °C (0, 30 e 60 min) os valores médios de motilidade progressiva (Figura 3a), vigor (Figura 3b) e células com acrossomas íntegros (Figura 3c), não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais (G1, G2, G3 e G4). Todavia, nestes parâmetros (motilidade progressiva, vigor e percentual de células com acrossomas íntegros), foram constatadas reduções drásticas nos valores durante todo o período de incubação a 37 °C (TTR), diferindo significativamente ($P < 0,05$) entre os tempos de avaliação (0, 30 e 60 min).

A análise da correlação de Pearson (Tabela 4) evidenciou correlação significativa apenas entre motilidade progressiva e vigor espermático ($P = 0,0001$), em todas as amostras de sêmen criopreservadas, independente da adição de Trolox e/ou GSH ao diluente Tris-gema.

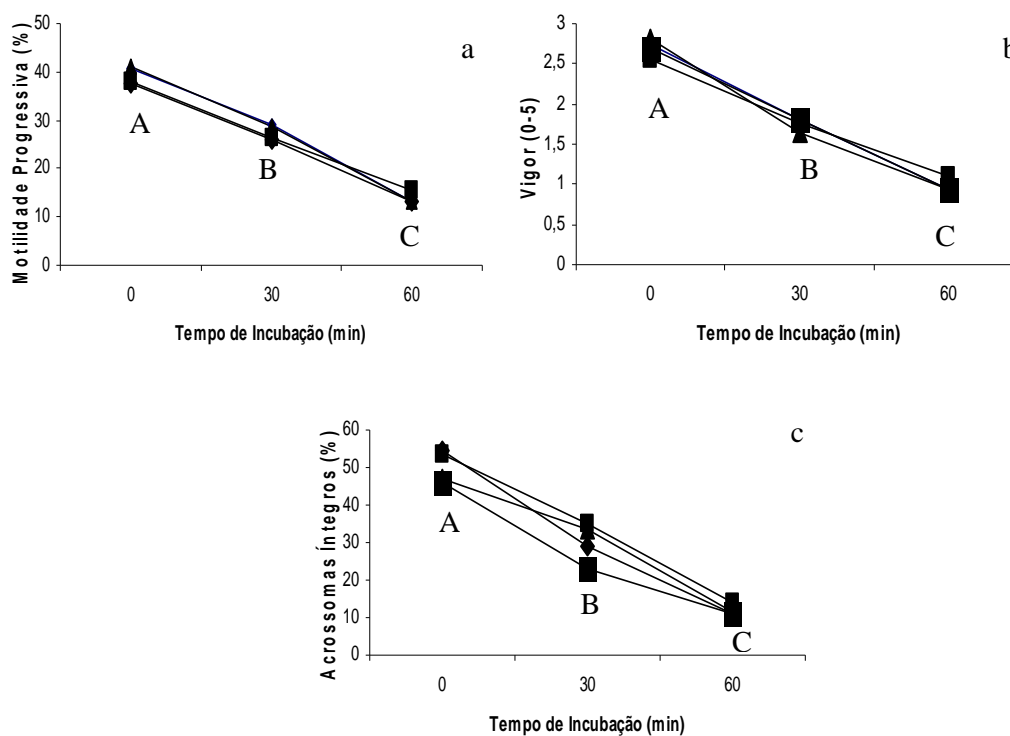


FIGURA 3. Motilidade progressiva (a), vigor espermático (b) e acrossomas íntegros em amostras de sêmen de cães submetidas à congelação em Tris-gema acrescido de Trolox e Glutathione reduzida (G1= sem antioxidante, ♦; G2= 200 μ M/L de Trolox, ■; G3= 2 μ M/L de GSH▲ ; e G4= 200 μ M/L de Trolox + 2 μ M de GSH, ■), durante o teste de termo-resistência a 37 °C. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significante ($P < 0,05$) entre tempos de incubação.

Tabela 4 – Matriz de correlação de Pearson (r) e respectivos níveis de significância entre pares de variáveis do sêmen de cães sem e com adição de Trolox eou GSH

	MP	Vigor	Acrossoma
MP	1	0,52 (0,0001)	-0,01 (0,9671)
Vigor		1	-0,10 (0,5634)
Acrossoma			1

MP = Motilidade Progressiva.

DISCUSSÃO

Neste estudo, a adição da Glutathione reduzida (GSH) e do análogo hidrossolúvel da vitamina E (Trolox), em todos os experimentos, não melhorou a motilidade progressiva e vigor espermático, em relação ao Grupo Controle (sem adição de antioxidante), discordando dos resultados de NETTO et al. (2007), ao sugerirem que a adição de 50-60 mg de vitamina E/Kg de ração de cães da raça Boxer melhora a qualidade espermática. Os resultados obtidos neste trabalho também foram inferiores àqueles relatados por COLETO (2006), ao observarem $70,00 \pm 10,00\%$ de células móveis e $2,67 \pm 0,58$ de vigor em cães da raça Cocker Americano utilizando diluidor Tris-gema suplementado com 200 μM de Trolox. Da mesma forma, em varrões, GROSSFELD (2007) constatou que a adição de substâncias antioxidantes ao diluidor de sêmen melhora significativamente a motilidade espermática pós-descongelação.

Vale ressaltar que, em todos os experimentos (1, 2 e 3) obteve-se, até 15 min de incubação a 37 °C, motilidade progressiva mínima de 30% recomendada pelo CBRA (1998) para o sêmen canino. No entanto, observou-se redução da motilidade progressiva durante o TTR, corroborando com os relatos de BREININGER et al. (2005), durante incubação a 37 °C nas amostras de sêmen descongeladas de reprodutores suínos, alcançando valores próximos a zero após 4 horas de avaliação, em todos os tratamentos (200, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de α -tocopherol). Ressalta-se, todavia, que nas duas primeiras horas de incubação, estes autores constataram aumento ($P < 0,05$) no percentual de células móveis nos grupos tratados, em relação ao Grupo Controle (sem adição de antioxidante), diferindo dos resultados obtidos neste estudo.

MICHAEL et al. (2007) testaram a adição de vitamina E na concentração de 0,3 mM ao diluidor e obtiveram médias de $44,50 \pm 3,52$ de células móveis, não diferindo do Grupo Controle ($39,0 \pm 2,90$), evidenciando que, apesar do α -tocopherol ser um dos mais potentes antioxidantes, seus benefícios na qualidade do sêmen descongelado são limitados. Esses resultados corroboram com os observados neste estudo, onde as concentrações de 200 (G2) e 300 $\mu\text{M/L}$ (G3) de Trolox (Exp. 1) não preservaram a motilidade espermática, ao evitar o desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante (COLETO, 2006).

Da mesma forma, o vigor espermático não apresentou melhora significativa ao se suplementar as amostras de sêmen com Trolox (200 e 300 $\mu\text{M/L}$) e GSH (2 e 5 $\mu\text{M/L}$), quando comparadas às do Grupo Controle, nos três experimentos. Ao se avaliar o vigor

espermático, de acordo com o período de avaliação pós-descongelação, constata-se que os valores observados imediatamente após a descongelação encontravam-se compatíveis com sua utilização em IA de cadelas ($> 2,5$). No entanto, foram inferiores aos 3,85 pontos obtidos por Moura et al. (2002), utilizando amostras de 9 cães congeladas com Tris-gema sem adição de antioxidantes. Em contrapartida, COLETO (2006) encontrou médias de vigor espermático para as amostras de sêmen de cão, criopreservadas sem antioxidantes (Grupo Controle), igual a 3,33 pontos, valores também superiores àqueles observados no Experimento 1 após adição de 200 μM de Trolox (2,67 pontos). Acredita-se que os resultados inferiores obtidos neste estudo, quando comparados aos relatados por outros autores, podem ser atribuídos à variação individual, raça e manejo reprodutivo dos cães utilizados. Ressalta-se, ainda, que durante a realização do TTR (37 °C) constatou-se redução drástica destes valores até o término do período de incubação (60 min), sem haver interferência da adição dos antioxidantes utilizados.

Os principais locais de produção de ROS nos espermatozóides são as mitocôndrias, através da liberação de elétrons após a ocorrência de danos causados pela congelação/descongelação (BROUWERS & GADELLA, 2003), e na membrana plasmática, dependente do sistema NADPH oxidase (AGARWAL et al., 2005). Assim, neste estudo, esperava-se que, à medida que os espermatozóides retomassem seu metabolismo normal, a adição de GSH melhorasse a sua atividade metabólica (SINHA et al., 1996), aumentando o vigor espermático.

Além disso, esperava-se maior porcentual de células com acrossomas íntegros ao se adicionar antioxidantes nas amostras de sêmen submetidas à criopreservação (MIESTER & ANDERSON, 1983), contrapondo os efeitos negativos da elevada produção de ROS ocorrida durante o processo de congelação (AGARWAL et al., 2003). Contudo, os resultados obtidos nos Experimentos 2 e 3, no momento 0, mesmo sem evidenciarem diferença significativa entre os grupos experimentais, foram superiores aos relatos por COLETO (2006), que, ao congelar sêmen de três cães da raça Cocker Americano, utilizando diluidor à base de Tris-gema suplementado com antioxidante (Trolox e Vitamina C), obteve 39,33% e 38,67% de células com acrossomas intactos, respectivamente. Assim, constata-se que, uma vez que a região acrossomal é o local mais susceptível a danos causados por choque térmico (WATSON, 1995; HOLT, 2000), devido ao alto teor de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas suas membranas (POULOS et al., 1973), os espermatozóides deste estudo apresentaram poucos danos na membrana acrossomal, independente da adição de antioxidantes. No entanto, os resultados dos Experimentos 2 e 3 são semelhantes aos de

OLIVEIRA (2003), onde obteve médias de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras de $49,7 \pm 4,7\%$, $67,6 \pm 4,1\%$ e $56,7 \pm 7,5\%$, respectivamente, testando três diluidores (Tris5%EG, Lac5%EG e Lac5%DF), e com os dados de BUENO et al. (2001), ao obtiveram $67,7 \pm 7,4\%$ e $64,1 \pm 6,4\%$ de células com acrossomas íntegros, testando dois protocolos de refrigeração (caixa de isopor e *biocool*).

Levando-se em consideração o tempo de incubação, esperava-se que a adição de Trolox e GSH, nas concentrações utilizadas, preservasse as membranas acrossomais dos espermatozóides de cães, uma vez que durante o processo de maturação, os espermatozóides perdem a maior parte de seu citoplasma, limitando a defesa contra o estresse oxidativo e tornando-se dependentes dos antioxidantes presentes no plasma seminal (BAUMBER et al., 2005), evidenciando a importância da utilização de substâncias antioxidantes ao meio diluidor. Os resultados obtidos neste estudo divergem daqueles relatados por PEIXOTO et al. (2007), ao evidenciarem que a adição de vitamina C ($600 \mu\text{M/L}$) e Trolox ($60 \mu\text{M/L}$) proporcionaram maior proteção às membranas acrossomais de espermatozóides ovinos, bem como com os resultados de BECONI et al. (1993), ao obterem maior porcentual de espermatozóides com acrossomas e mitocôndrias intactas ao adicionarem as vitaminas C (5 mM de ascorbato) e E (1,0 mg/mL acetato de α -tocoferol) ao diluidor de sêmen bovino.

O maior porcentual de células espermáticas sem estresse oxidativo observado nas amostras suplementadas com GSH (Experimento 2), quando comparadas às do Grupo Controle, provavelmente pode ser explicado pelo fato desta enzima ser responsável pela inativação das ROS (COTRAN et al., 1989), resultando em menor grau de estresse oxidativo na célula espermática (ALVAREZ & STOREY, 1989). Estes resultados corroboram com os relatos de COLETO (2006), ao constatar maior porcentual de células espermáticas sem estresse oxidativo nas amostras suplementadas com Trolox e vitamina C.

Apesar de não haver sido dosada a concentração de GSH neste estudo, acredita-se que tenha havido redução nas concentrações desse antioxidante nos espermatozóides criopreservados, conforme relatado em touros (BILODEAU et al., 2000), homens (MOLLÁ et al., 2004) e varrões (GADEA et al., 2004). Evidências sugerem que o estresse oxidativo (JELEZARSKY et al., 2008) ou a ruptura das membranas celulares são as principais causas de redução das características funcionais dos espermatozóides, pós-descongelção, e que o GSH protege as membranas dos espermatozóides através da inibição da peroxidação lipídica (MIESTER & ANDERSON, 1983) e dos danos ocorridos durante a descongelção (COTRAN et al., 1989). GADEA et al. (2004) observaram aumento da capacidade fecundante, pós-descongelção, dos espermatozóides suínos criopreservados com diluente

suplementado com 5 mM de GSH, embora não tenha observado diferença nos parâmetros normais do sêmen. Estes relatos corroboram com os resultados de espermatozóides com acrossomas e DNA íntegros obtidos neste estudo, apesar de terem sido constatados menores percentuais de células com estresse oxidativo nas amostras suplementadas com 2 e 5 μ M de GSH.

A sobrevivência dos espermatozóides após congelação e descongelação parece depender das propriedades básicas da membrana plasmática, como composição bioquímica, resistência física, comportamento térmico e osmótico (De LEEUW et al., 1991). Isto pode explicar as diferenças encontradas nas amostras de sêmen dos cães deste estudo, e também ao fato da associação dos dois antioxidantes, um protetor de membrana (Trolox) e o outro removedor de ROS (GSH), não terem determinado efeitos positivos nos parâmetros espermáticos observados *in vitro*, quando comparadas a outros estudos.

Por conseguinte, com base nos resultados de estresse oxidativo, conclui-se que a Glutathiona reduzida, nas concentrações de 2 e 5 μ M/L, pode ser adicionada ao diluente de criopreservação do sêmen de cães. Entretanto, outras pesquisas devem ser realizadas visando estudar, *in vivo*, o efeito da adição deste antioxidante na preservação da capacidade fertilizante destes gametas.

AGRADECIMENTOS

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do mestrado; Ao Canil Brave Basset, na pessoa de Tatiana Pagliane, por ter permitido a utilização dos cães, das instalações, e auxiliado na realização do estudo; ao Prof. Dr. Pierre Castro Soares/UFRPE, pela colaboração com as avaliações estatísticas, e ao Prof. Dr. Lêucio Câmara Alves/UFRPE, pela colaboração e amizade.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A.; SAID, T.M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 26, p. 654–60, 2005.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A. BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 4, p. 829-843, 2003.

- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 9, p. 367–376, 1988.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protectin mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Research**, New York, v. 23, p.77–90, 1989.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, p.1061-1069, 2001.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, 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**, Stoneham, v. 40, p. 841, 1993.
- BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 55, p. 282–288, 2000.
- BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; O'FLAHERTY, C.M. et al. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 2126–2135, 2005.
- BROUWERS, J.F.H.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 35, p. 1382–1391, 2003.
- BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. et al. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. I – efeito do meio diluidor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, p. 364-371, 2001.
- CBRA-Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 1996. 65p. (Elaborado conforme convênio CBRA/MA n. 017/1996).
- CHRISTIANSEN, I.J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1986. 363p.
- COLETO, Z.F. **Congelação do sêmen da espécie canina adicionando antioxidantes**. 2006. 103p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.

- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Pathologic Basis of Diseases**, 4th ed. Philadelphia : W.B. Saunders Co, 1989. 1280 p.
- De LEEUW, F.E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 1, p. 95-104, 1991.
- DRÖGE, W.; MIHM, S.; BOCKSTETTE, M. et al. Effect of reactive oxygen intermediates and antioxidants on proliferation and function of T lymphocytes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 234, p. 135–151, 1994.
- EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.
- GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A. et al. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, Stoneham, v. 62, p. 690–701, 2004.
- GROSSFELD, R. **Experiments to improve the quality of sex-sorted fresh and frozen porcine spermatozoa**. 2007. 185p. Tese (Ph.D degree) – Faculty of Agricultural Sciences – University Göttingen, Germany.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, p. 3-22, 2000.
- HSU, P.C.; LIU, M.Y.; HSU, C.C. et al. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicology**, Limerick, Irlanda, IE: Elsevier Scientific Publishers, v. 128, p. 169-179, 1998.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 10, p. 156-65, 1994.
- JELEZARSKY, L.; VAISBERG, C.H; CHAUSHEV, T. et al. Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of . (GPx) in boar semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, p. 139-145, 2008.
- MACHLIN, L.J. In **Vitamin E Handbook of vitamins: nutritional, biochemical, and clinical aspects**. 2ed. Marcel Dekker, New York - Basel, p. 99-145, 1984.
- MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, p. 361–370, 2000.
- MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 32, n. 8, p. 595–603, 1999.

- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 327-344, 2002.
- MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, p. 204-212, 2007.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial, inseminação artificial nos cães**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 750p.
- MIESTER, A.; ANDERSON, L. Glutathione. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 52, p. 71-90, 1983.
- MOLLÁ, M.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A. et al. Freezing procedure produces a reduction in the human spermatozoa glutathione content. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 25 (Suppl.), p. 45, 2004.
- MORTON, D.B.; BRUCE, S.G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 39, p. 311-316, 1989.
- MOURA, C.S.; CAVALCANTI, M.C.O.; GUERRA, M.M.P. et al. Teste de avaliação *in vitro* e criopreservação do sêmen de cão utilizando diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 9, p. 102-106, 2002.
- NETTO, L. M. C.; GÓES, P. A. A.; RODRIGUES, M. P. et al. Efeito da vitamina E e do levedo de cerveja na qualidade espermática de cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba, PR. **Anais ...** Belo Horizonte, MG: CBRA, 2007. p.171.
- OLIVEIRA, E.C.S. **Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino**. 2003. 61p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PEIXOTO, A.L.V. de A. **Efeito da adição de Vitamina C e Trolox ao diluidor utilizado para criopreservação de sêmen ovino**. 2007. 94p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.
- POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 46, p. 541-549, 1973.
- RODRIGUES, B.A. **Efeito de diferentes concentrações de albumina sérica bovina (BSA) em diluidor à base de tris sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen canino criopreservado**.

1997. 112p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

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

SAS. **Statistical Analysis System Institute**, General Linear Model: 8.2, Cary. SAS Institute, 2000.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C.; SILVA, L. D. M. Criopreservação do sêmen canino: Revisão. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 11, n. 2, p. 119-129, 2001.

SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K. et al. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 237-243, 1996.

STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Protein oxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 899, p. 191–208, 2000.

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

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

YLÄ-HERTTUALA, S. Oxidized LDL and atherogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 874, p. 134–137, 1999.