

ANA LYDIA VASCO DE ALBUQUERQUE PEIXOTO

**EFEITO DA ADIÇÃO DE VITAMINA C e TROLOX AO DILUIDOR
UTILIZADO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

RECIFE-PERNAMBUCO

Fevereiro/2007

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

**EFEITO DA ADIÇÃO DE VITAMINA C e TROLOX AO DILUIDOR
UTILIZADO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

Tese 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
Doutor em Ciência Veterinária.

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

RECIFE-PERNAMBUCO

Fevereiro/2007

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

P379e Peixoto, Ana Lydia Vasco de Albuquerque
Efeito da adição de Vitamina C e Trolox ao diluidor
utilizado para criopreservação de sêmen ovino / Ana
Lydia Vasco de Albuquerque Peixoto. -- 2007.
94. f. : il.

Orientadora : Maria Madalena Pessoa Guerra
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Univer –
sidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de
Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 636. 308 926

1. Antioxidante
 2. Sêmen ovino
 3. Congelação
 4. Refrigeração
- 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 DE VITAMINA C e TROLOX AO DILUIDOR
UTILIZADO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO

Tese de Doutorado elaborada por

Ana Lydia Vasco de Albuquerque Peixoto

Aprovada em :/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a MARIA MADALENA PESSOA GUERRA
Orientadora – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. JOSÉ FERREIRA NUNES
Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino da UECE

Prof. Dr. ÁUREA WISCHRAL
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof^a Dr^a ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Prof. Dr. MANOEL ADRIÃO FILHO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Prof. Dr. PIERRE CASTRO SOARES
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

A Ana Beatriz, amada filha, pela sua existência,
força que me motiva a superar obstáculos em busca
de um futuro próspero.

Dedico

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por estar sempre presente em minha vida, iluminando e abrindo meus caminhos, sobretudo mostrando que as dificuldades existem para serem superadas, favorecendo o amadurecimento espiritual e emocional;
- Aos meus Pais, por terem me dado a vida e ensinado a viver com dignidade, respeito, humildade, perseverança e coragem, ensinamentos inesquecíveis;
- Ao meu companheiro, Jairo, pela dedicação e compreensão nos momentos de ausência, cansaço e impaciência;
- Ao meu irmão Paulo e minha cunhada Rita, que se fizeram sempre presentes nessa jornada, apoiando-me e acolhendo-me incondicionalmente, sempre com palavras de incentivo;
- Aos meus irmãos Júnior e Neto, que mesmo distantes acompanharam meu crescimento e acreditaram em mim;
- À Prof^a Maria Madalena Pessoa Guerra, pela oportunidade de buscar meu grande sonho, pela atenção, profissionalismo, compreensão, exemplo de garra, conquistas, respeito e personalidade;
- Aos meus queridos amigos Sônia, Mércia, Márcia, Lamartine e Sarah, pela atenção e pelo acolhimento dispensados;
- Aos amigos Diogo e Lígia, pela paciência, atenção, disponibilidade, ensinamentos e colaboração imprescindível que culminaram com a concretização deste trabalho;
- Ao amigo Pedro, pela dedicação, conhecimentos e momentos compartilhados, sua participação foi essencial para a execução desse estudo;
- Aos amigos Roberto Rômulo, Aninha, Rômulo, Sandra Regina e Sílvio, pelo incentivo, apoio e ensinamento dispensados, muito valiosos para a realização desse sonho;
- Ao amigo Wagner, companheiro de viagem, de angústias, de conquistas e de alegrias proporcionados pela vida;
- Aos Professores Dora, Manoel, Ohashi, Haldson e Lêucio, pelo incentivo, apoio e ensinamentos;
- Aos amigos Flaviana, Waléria, Yáskara, Leila, Cláudia, Sérgio, Ricardo e Kátia, pelo incentivo, ensinamento, apoio, atenção e compreensão, que mesmo nos momentos de fraqueza, suas palavras fortaleciam-me;
- Ao amigo Wellyngton, pela ajuda na análise estatística e amizade espontânea durante o longo caminho;

À amiga Sildivane, pelo seu desprendimento em abdicar do convívio de sua família em prol da execução desse estudo;

Aos colegas, Ana Katarina, Sônia, Joana, Alcir, Francètte, Líliam, Keila, Evódia, Karen, Cláudia, Cristiane, Andréa, Robson, Renato e Carminha pelo apoio fundamental para a execução deste trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, nas pessoas da Prof.^a Áurea Wischral e da secretária Edna Cherias, pela atenção e compreensão;

Aos meus alunos e ex-alunos dos cursos de Medicina Veterinária, Nutrição, Zootecnia e Ciências Biológicas, pelo incentivo nos momentos de angústia durante o árduo desafio em conciliar trabalho e estudos;

À Fazenda Pocinhos D' água e à Usina Utinga Leão, nas pessoas de Érica e Ricardo Fellippe, respectivamente, pela oportunidade em disponibilizar os prestimosos animais para execução deste experimento;

Ao Centro de Estudos Superiores de Maceió, Universidade Estadual de Alagoas e à Universidade Estadual do Ceará, pelo apoio dado, permitindo-me cumprir esta etapa;

A todos que colaboraram direta ou indiretamente no amadurecimento pessoal, indispensável à concretização deste sonho.

“O ser humano não pode deixar de cometer erros, pois é com os erros que os homens de bom senso aprendem a sabedoria para o futuro”.

Plutarco

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

‰: Porcentual

AI: Acrossoma intacto

ALH: Amplitude de deslocamento da cabeça

AR: Acrossoma reagido

ATP: Adenosina Trifosfato

BCF: Frequência do batimento de flagelo

BHT: Hidroxitolueno Butilato

BSA: Bovine serum albumine (Albumina sérica bovina)

CASA: Sistema Computadorizado de Análise Espermática

CESMAC: Centro de Estudos Superiores de Maceió

DMSO: Dimetilsufóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DP: Desvio Padrão

Fé⁺²: íon ferro

G-6-PDH: Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

Hz: Hertz

IA: Inseminação Artificial

Kg: Quilograma

LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade

LIN: Linearidade

LPO: Peroxidação lipídica

M: Média

MF: Motilidade Final

mg: Miligrama

MI: Motilidade inicial

min: minuto

MP: Motilidade progressiva

MT: Motilidade Total

NADPH: Nicotina Adenina Dinucleotídeo Fosfato

nmol: Nanomolar

NO⁻: ânion Nitroxila
NO⁺: Cátion Nitrosonium
O₂⁻: Radical Superóxido
OH⁻: Radical Hidroxila
ONOO⁻: Peroxinitrito
PBS: Fosfato salino tamponado
pH: Potencial hidrogeniônico
RNA: Ácido Ribonucléico
RNS: Espécies de Nitrogênio Reativas
ROS: Espécies de Oxigênio Reativas
SOX: Estresse oxidativo
STR: Progressividade
TDM: Taxa de degradação da motilidade
TES: Ácido Tris-Hidrometil-Aminometano-Sulfônico
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
UNEAL: Universidade Estadual de Alagoas
v:v: Volume:Volume
VAP: Velocidade de trajeto
VCL: Velocidade curvilínea
VSL: Velocidade progressiva
µm: micrômetro
µm/s: micrômetros por segundo
µM: micromolar

RESUMO

Os antioxidantes previnem os danos oxidativos durante processos de congelamento/descongelamento e período de incubação causados pelas ROS/RNS às células espermáticas, melhorando os parâmetros espermáticos (vigor, motilidade e integridade acrossomal), além de evitar danos ao DNA. Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da adição de vitamina C e Trolox ao diluidor utilizado para criopreservação de sêmen ovino, utilizando o ejaculado de onze carneiros colhidos através de vagina artificial. Após avaliação macroscópica (aspecto, cor e viscosidade) e microscópica (motilidade e vigor), o *pool* foi diluído em Tris-gema (Exp. 1, 2 e 3) e Fiser (Exp. 2) e suplementado com antioxidantes: G1) Diluente (Controle); G2) Diluente + 600 µM/L de vitamina C; G3) Diluente + 60 µM/L de Trolox e G4) Diluente + 600 µM/L de vitamina C + 60 µM/L de Trolox. A congelamento foi realizada pelo método automatizado utilizando duas curvas: Rápida (C2= -0,5 °C/minuto, de 25 °C a 5 °C, e a -12,5 °C/minuto, de 5 °C a -120 °C) para os Exp. 1 e 2 e Lenta (C1= -0,25 °C/minuto, de 25 °C a 5 °C, e a -20 °C/minuto, de 5 °C a -120 °C) apenas para o Exp. 2, e pelo método convencional (90 minutos), onde após a refrigeração (5 °C) as amostras foram colocadas em nitrogênio líquido por 10 minutos até atingirem -120 °C (Exp. 2 e 3). As palhetas foram envasadas com 100 (Exp. 1), 75 (Exp. 2 e 3) e 200 (Exp. 2) x 10⁶ espermatozoides e, em seguida, armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C). As amostras de sêmen foram avaliadas imediatamente após a descongelamento (0 min; Exp. 1, 2, e 3) e depois de 30 (Exp. 1 e 2) e 60 min (Exp. 1, 2 e 3) de incubação a 37 °C (30 e 60 minutos), quanto à motilidade progressiva (MP), vigor, estresse oxidativo, integridade de acrossoma e de DNA (Exp. 1, 2 e 3) e quanto a motilidade cinética espermática (MT, MP, VSL, VCL, VAP, LIN, STR, ALH, e BCF; Exp. 3). No Exp. 1, houve diferença significativa (p<0,05) entre os tempos de avaliação (0, 30 e 60 min) nos parâmetros de integridade de acrossoma e estresse oxidativo para os grupos tratados com vitamina C e Trolox e o grupo controle (p>0,05). Todavia, no Exp. 2 os percentuais para MP, vigor e integridade de acrossoma diferiram (p<0,05) entre tempos de incubação (0 e 60 min), sendo que o grupo suplementado com Trolox (G3) apresentou maiores percentuais de células com estresse oxidativo (p<0,05), quando comparado ao grupo suplementado com vitamina C (G2). Para o Exp. 3, constatou-se que o tempo de incubação interferiu na cinética espermática (MT, MP, VSL, VAP, LIN e STR), na integridade acrossomal e no grau de estresse oxidativo, além de apresentar correlação negativa entre integridade acrossomal e estresse oxidativo para o G3 (Trolox), correlação positiva entre integridade do acrossoma e MT para o G2 (vitamina C) e negativa para estresse oxidativo e LIN para o G2 (vitamina C), após 60 minutos de incubação. Contudo, pode-se concluir que o tempo de incubação interfere negativamente na viabilidade *in vitro* das células espermáticas independente da adição de vitamina C e Trolox; ao se utilizar o método convencional de congelamento de sêmen ovino diluído em Tris-gema, a adição de vitamina C e Trolox proporciona menos estresse oxidativo às células espermáticas imediatamente após a descongelamento; Ao se usar o método automatizado de congelamento de sêmen ovino diluído em Fiser, deve-se utilizar a curva lenta de refrigeração (0,25 °C/min), sem necessidade da suplementação de vitamina C (600 µM/L) e Trolox (60 µM/L) ao diluente e, Com base na avaliação da cinética, da integridade acrossomal e do estresse oxidativo, a adição de ácido ascórbico e Trolox não minimiza os efeitos negativos da criopreservação e da incubação de sêmen ovino à temperatura de 37 °C, pós-congelamento.

ABSTRACT

The antioxidant substances prevent the oxidative damages during freezing/thawing processes and incubation period caused by ROS to sperm cells, improving the sperm parameters (vigor, motility and acrosome integrity), besides avoid damages to DNA. The aim of this study was to evaluate the effect of vitamin C and Trolox addition to diluent used to ram semen cryopreservation. The ejaculates of eleven rams were harvested by artificial vagina. After macroscopic (aspect, color and viscosity) and microscopica (motility and vigor) evaluation the pool was diluted in Tris-egg yolk (Exp. 1, 2 and 3) and Fiser (Exp. 2) and supplemented with antioxidant substances: G1) Diluent (Control); G2) Diluent + 600 $\mu\text{M/L}$ of vitamin C; G3) Diluent + 60 $\mu\text{M/L}$ of Trolox and G4) Diluent + 600 $\mu\text{M/L}$ of vitamin C + 60 $\mu\text{M/L}$ of Trolox. The freezing was done by automatized method using two curves: fast (C2= $-0.5\text{ }^\circ\text{C/minute}$ of 25 to $5\text{ }^\circ\text{C}$, and $-12.5\text{ }^\circ\text{C/minute}$ of 5 to $-120\text{ }^\circ\text{C}$) to the Exps. 1 and 2, and slow (C1= $-0.25\text{ }^\circ\text{C/minute}$ of 25 to $5\text{ }^\circ\text{C}$, and $-20\text{ }^\circ\text{C/minute}$ of 5 to $-120\text{ }^\circ\text{C}$) to the Exp. 2, and by conventional method (90 minutes), where after the refrigeration ($5\text{ }^\circ\text{C}$) the samples were placed in liquid nitrogen during 10 minutes until reaching $-120\text{ }^\circ\text{C}$ (Exp. 2 and 3). The straws with 100 (Exp. 1), 75 (Exp. 2 and 3) and 200 (Exp. 2) $\times 10^6$ spermatozoa were transferred into the liquid nitrogen storage container ($-196\text{ }^\circ\text{C}$). The semen samples were evaluated after thawing (0 min; Exp. 1, 2, and 3) and after 30 (Exp. 1 and 2) and 60 min (Exp. 1, 2 and 3) of the incubation at $37\text{ }^\circ\text{C}$ according to progressive motility, vigor, oxidative stress, acrosome and DNA integrity (Exp. 1, 2 and 3) and sperm kinetics (MT, MT, VSL, VCL, VAP, LIN, STR, ALH, and BCF; Exp. 3). In the Exp. 1, there was significant difference ($p < 0.05$) among evaluation times (0, 30 and 60 min) in the parameters of acrosome integrity and oxidative stress for the groups supplemented with vitamin C and Trolox and the Control group ($p > 0.05$). However, in the Exp. 2 the percentages of PM, vigor and acrosome integrity had significant difference ($p < 0.05$) between incubation times (0 and 60 min), being that the group supplemented with Trolox (G3) presented greater cell percentages with oxidative stress ($p < 0.05$) when compared to the vitamin C group (G2). On the Exp. 3, there was evidence that the incubation time intervened on the sperm kinetics (MT, MP, VSL, VAP, LIN and STR), acrosome integrity and oxidative stress of sperm cells, besides presenting negative correlation between acrosome integrity and oxidative stress for the G3 group (Trolox), positive correlation between acrosome integrity and progressive motility to the G2 group (vitamin C) and negative correlation between oxidative stress and LIN to the G2 group (vitamin C) after 60 minutes of incubation. However, it can be concluded that the incubation time intervenes negatively on *in vitro* viability of the sperm cells independent of the vitamin C and Trolox addition; using the conventional method of cryopreservation of ram semen diluted in Tris-egg yolk, the vitamin C addition provides less oxidative stress on the spermatozoa after post-thawing; Using the automatized method of cryopreservation of ram semen diluted in Fiser, it should be used the slow curve of refrigeration ($0.25\text{ }^\circ\text{C/min}$) without necessity of vitamin C ($600\mu\text{M/L}$) and Trolox ($60\mu\text{M/L}$) addition and; Based on the kinetics, acrosome integrity, and oxidative stress, the addition of ascorbic acid and Trolox do not minimizes the negative effects of the cryopreservation and the incubation of ram semen at temperature of $37\text{ }^\circ\text{C}$ after thawing.

SUMÁRIO

Página

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

EPÍGRAFE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Criopreservação.....	14
2.2 Composição dos diluidores.....	17
2.3 Espécies de oxigênio reativas.....	19
2.4 Antioxidantes.....	21
2.4.1 Vitamina C.....	22
2.4.2 Vitamina E.....	25
2.4.3 Associação de vitamina C e α -tocoferol.....	27
3 EXPERIMENTOS.....	29
3.1 Efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com Tris-Gema suplementado com vitamina C e Trolox.....	30
3.2 Viabilidade <i>in vitro</i> do sêmen ovino criopreservado em diluente Tris-gema ou Fiser acrescidos de vitamina C e Trolox utilizando dois métodos de congelamento.....	49
3.3 Avaliação da cinética, da integridade acrossomal e do estresse oxidativo em espermatozoides ovinos criopreservados em Tris-Gema acrescido de ácido ascórbico e Trolox.....	68
4 REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen oferece muitas vantagens à indústria da produção animal, principalmente quando associada com avaliação genética e programas de seleção. Entretanto, em muitas espécies, o maior obstáculo à utilização de biotecnologias reprodutivas está relacionado aos danos causados à membrana espermática durante os procedimentos de refrigeração, congelação e descongelação, reduzindo a viabilidade e a motilidade das células espermáticas e, conseqüentemente, a fertilidade após a inseminação artificial (IA), quando comparada àquela obtida utilizando sêmen fresco (SALAMON e MAXWELL, 1995).

Durante o procedimento de congelação as células espermáticas são inicialmente submetidas a temperaturas de 5 a 4 °C, causando alterações na permeabilidade das membranas (NOILES et al., 1995), sugerindo que a transição da fase da membrana ocorre nessa temperatura e está associada ao aumento de sua fragilidade (WATSON, 1995). Alterações na transição da fase lipídica e/ou aumento na LPO da membrana plasmática tem como conseqüência redução na velocidade e na porcentagem de espermatozóides móveis (WATSON, 1995; ISACHENKO et al., 2004), além de grandes alterações no volume de água intracelular, resultando em considerável estresse mecânico em suas membranas (NOILES et al., 1995). Assim, acredita-se que as conseqüências das injúrias causadas pelo procedimento de criopreservação interfiram no transporte e na sobrevivência espermática no sistema genital da fêmea (SALAMON e MAXWELL, 1995).

Os espermatozóides ovinos são tolerantes às diferentes velocidades de congelação, porém a congelação rápida pode afetar a sobrevivência espermática, proporcionando baixos percentuais de motilidade (SALAMON e MAXWELL, 2000). No entanto, Kumar et al. (2003), estudando o efeito da velocidade de refrigeração na sobrevivência de espermatozóides mamíferos congelados em máquina, observaram que a refrigeração na velocidade de -30 °C/minuto determina menos danos ao acrossoma, enquanto a motilidade individual progressiva é superior ao se utilizar redução de temperatura de -50 °C/minuto quando comparada àquela de -30 °C/minuto.

A avaliação da viabilidade *in vitro* da célula espermática tem sido amplamente realizada através da estimativa da sobrevivência espermática e da porcentagem de espermatozóides com movimentos progressivos em microscopia óptica (ROWE et al., 1993), porém estas técnicas não são acuradas ou repetitivas, em virtude do pequeno número de células avaliadas e da ausência de objetividade, associada à possibilidade de erro humano

(VERSTEGEN et al., 2002). Atualmente, o Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA) apresenta-se como método acurado de avaliação cinética dos espermatozóides (HOLT, 2000), e a interpretação dos dados é feita através da mensuração de parâmetros de movimentação da célula espermática (VERSTEGEN et al., 2002).

Irreversíveis reduções na motilidade, na integridade morfológica e na capacidade fertilizante dos espermatozóides são causadas também pelo acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo celular ou, principalmente, pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) decorrente da redução univalente de oxigênio, como por exemplo, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio (MISRA e FRIDOVICH, 1972; WANG et al., 1997; BAUMBER et al., 2003ab). O organismo possui mecanismos de controle contra a elevada produção de ROS através da produção de substâncias antioxidantes. No plasma seminal, os antioxidantes atuam de maneira decisiva na proteção aos espermatozóides contra a quantidade excessiva de ROS (SIKKA et al., 1995), a qual determina estresse oxidativo danificando essas células (JANSSEN et al., 1993).

O ácido ascórbico destaca-se por sua ação antioxidante em virtude de atuar como inibidor de uma grande variedade de ROS, o que explica sua habilidade em contrapor ao efeito do H_2O_2 nos danos causados ao DNA nuclear dessa célula (SIES et al., 1992). Por outro lado, a vitamina E pertence a um grupo de antioxidantes lipossolúveis (tocoferóis e tocotrienóis), constituindo-se no maior, senão o único antioxidante da membrana. Na espécie humana, tanto o ácido ascórbico quanto o α -tocoferol mantêm a integridade de DNA espermático, em virtude de reduzir os danos causados pela elevada concentração de ROS (FRAGA et al., 1991; DONNELLY et al., 1999). Guerra et al. (2005), testando diferentes concentrações de vitamina C e Trolox sob a viabilidade da célula espermática ovina, observaram que a adição de 2.400 μ M de vitamina C e 600 μ M de Trolox reduziram o efeito negativo da diluição e determinaram maior porcentual de espermatozóides com motilidade progressiva.

Dessa forma, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da adição de vitamina C e Trolox ao diluidor utilizado para criopreservação de sêmen ovino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criopreservação

Spallanzani (1776) foi o primeiro a observar que a diminuição da temperatura reduzia a atividade metabólica dos espermatozóides, permitindo seu armazenamento por período de tempo superior àquele observado com a temperatura ambiente (ENGLAND e PLUMMER, 1993). Polge et al. (1949) descreveram a ação crioprotetora do glicerol, proporcionando impacto significativo nos protocolos de congelação. Os métodos de congelação estão baseados na diluição, na refrigeração, na penetração do crioprotetor, no envasamento, na congelação, no armazenamento e na descongelação (HAMMERSTEDT et al., 1990).

A criopreservação resulta na redução da fertilidade espermática quando comparada com os resultados obtidos com sêmen fresco, devido à diminuição da motilidade espermática e à ocorrência de danos irreversíveis nas células sobreviventes (WATSON, 2000). Os espermatozóides de touros, carneiros e garanhões são altamente sensíveis ao choque térmico em comparação a espermatozóides de homens e de coelhos, que são relativamente resistentes à criopreservação (WATSON, 1995). Porém, o declínio na motilidade após congelação e descongelação da célula espermática pode ser explicado, parcialmente, pelas mudanças no transporte ativo e na permeabilidade da membrana plasmática da região caudal, além da disponibilidade de energia ou da ocorrência de danos nos constituintes do axonema (De LAMIRANDE e GAGNON, 1995; WATSON, 2000).

O procedimento de congelação pode diminuir ou paralisar algumas reações bioquímicas nos espermatozóides causando danos ou morte celular (SONGSASEN e LEIBO, 1997). A membrana plasmática do espermatozóide é considerada o local primário de danos durante a criopreservação (WATSON, 1995). Os procedimentos de congelação e descongelação induzem grandes alterações no volume de água (NOILES et al., 1995; MEDEIROS, 2003), desestabilizando a bicamada lipídica da membrana plasmática e promovendo alterações dos componentes da membrana celular, como desnaturação de proteínas da membrana, além de alteração do metabolismo energético celular, da osmolaridade ou do pH (WATSON, 2000).

As quantidades de colesterol e fosfolípidios existentes na membrana espermática exercem papel regulador no processo de capacitação espermática. Estudos mostram que o colesterol propicia efeito positivo na estabilidade de membrana e espermatozóides que

possuem baixo conteúdo de colesterol na membrana, apresentam maior susceptibilidade ao choque térmico (AURICH et al., 1997), já descrito em touros, carneiros e suínos (NOILES et al., 1995; WATSON, 1995).

Os lipídios e as proteínas de membrana apresentam-se distribuídos assimetricamente, e permitindo a movimentação dos componentes da membrana em fluidez (OLLERO et al., 1998). Todavia, estes componentes sofrem com a contínua redução da temperatura durante a congelação, determinando mudanças que produzem alterações físicas da membrana, passando do estado líquido ao gel, onde as cadeias de ácidos graxos apresentam-se aleatoriamente distribuídas e ordenadas paralelamente, produzindo estrutura rígida e tornando estas áreas fracas e susceptíveis a rupturas e fusões, e permeáveis a íons (HAMMERSTEDT et al., 1990). Por conseguinte, a permeabilidade seletiva da membrana plasmática pode ser comprometida durante a refrigeração (4 °C) da célula espermática, uma vez que os fosfolipídios sofrem um rearranjo (Figura 1), assumindo configuração hexagonal tipo II, formando micelas nas cabeças polares hidrofílicas que ficam posicionadas para dentro e suas caudas hidrofóbicas direcionadas para o lado externo (WATSON, 1995; HOLT, 2000; VALLÉ, 2001).

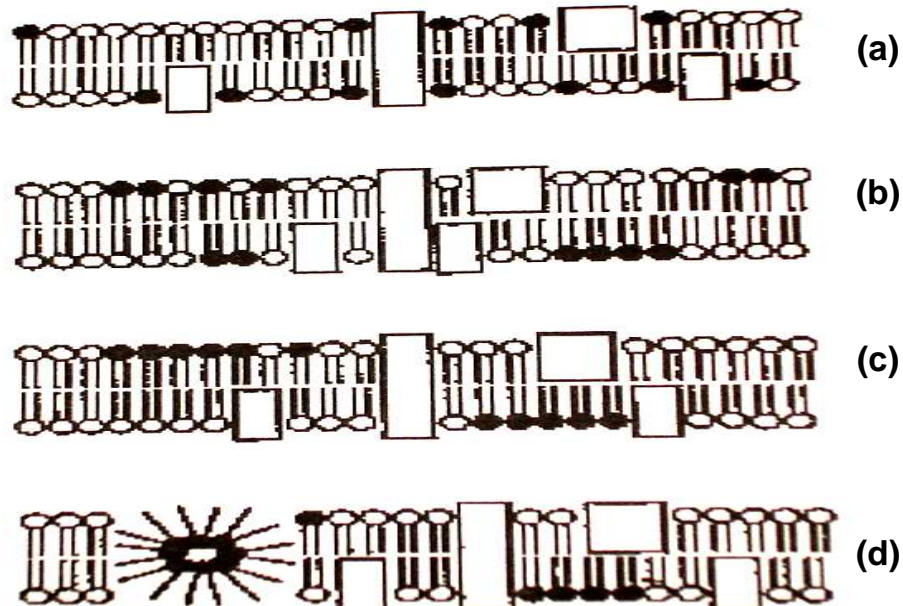


Figura 1. Diagrama da membrana plasmática original (a), refrigerada a 4 °C (b), reaquecida a 37 °C (c) e com a configuração hexagonal tipo II (d).

(FONTE: VALLÉ, 2001).

As principais crioinjúrias ocorrem durante os processos de congelação e descongelação (HOLT, 2000), reduzindo a motilidade e a integridade morfológica, incluindo

condensação e perda do material mitocondrial, fosforilação oxidativa e transporte de prótons que prejudicam a produção de energia (WATSON, 1995; HOLT, 2000; WATSON, 2000) e, conseqüentemente, a fertilidade (SALAMON e MAXWELL, 1995). Assim, a congelação pode causar lesões na membrana acrossomal e no DNA, além da cristalização dos solutos intracelulares, acarretando na redução da motilidade espermática (OEHINGER et al., 2000), alterando as propriedades enzimáticas e diminuindo a longevidade dos espermatozoides pós-descongelação através da ocorrência precoce da capacitação espermática (HOLT, 2000). Todavia, os microtúbulos flagelares da célula espermática também podem sofrer alterações durante o processo de criopreservação apesar de não terem sido detectados efeitos negativos na espécie ovina (JONES e MANN, 1977).

Estudos sugerem que a zona crítica de temperatura para a congelação varia entre -15 a -30 °C (POLGE, 1957) e 20 a 0 °C (SALAMON e MAXWELL, 1995; SALAMON e MAXWELL, 2000), sendo responsáveis pelo aparecimento de danos irreversíveis aos espermatozoides e evidenciando que, se a taxa de congelação não for reduzida corretamente, todas as células serão danificadas quando submetidas à temperatura de -80 °C (POLGE, 1957). Nas temperaturas entre -5 e -10 °C, os cristais de gelo começam a se formar no meio extracelular, mas o meio intracelular permanece não congelado e super refrigerado, em virtude da membrana plasmática impedir a formação de cristais de gelo no citoplasma (GAO e CRITSER, 2000). Segundo Drobnis et al. (1993), o grande desafio celular não consiste apenas na capacidade de suportar baixas temperaturas, mas transpor uma faixa de temperatura que varia de 0 a -15 °C, na qual a célula passa durante os procedimentos de congelação e descongelação.

Robertson et al. (1990) sugeriram que espermatozoides de mamíferos domésticos não sobrevivem à refrigeração rápida até a temperatura de 0 °C, determinando choque térmico que resulta em perda da permeabilidade seletiva da membrana plasmática ao cálcio, promovendo aumento excessivo da concentração intracelular e, conseqüentemente, redução da motilidade e determinação de necrose celular. Durante a refrigeração, proteínas integrais são agrupadas pela separação da fase lipídica, afetando a função dessas proteínas, como por exemplo, os canais iônicos de cálcio. Isto ocorre como conseqüência do aumento da permeabilidade da membrana após a refrigeração, acarretando sérios transtornos celulares na capacitação e na fusão das membranas plasmática e acrossomal externa (SONGSASEN e LEIBO, 1997; WATSON, 2000).

Em ovinos (KUMAR et al., 2003) e em caninos (SANTOS et al., 2003), a curva lenta de refrigeração proporcionou melhores porcentuais de motilidade pós-descongelação quando

comparada à curva rápida. Fato explicado por Muldrew e Mc Gann (1994) e Gao e Citser (2000), ao sugerirem que na refrigeração rápida, o espermatozóide não tem tempo suficiente para desidratar e manter o equilíbrio osmótico, aumentando a possibilidade de formação de cristais de gelo intracelulares e causando danos irreversíveis à célula. Todavia, na congelação lenta, as células desidratam devido ao meio extracelular hipertônico, eliminando a possibilidade de formação de grandes cristais de gelo intracelulares que causam danos morfofuncionais às células. No entanto, a congelação rápida seguida de descongelação rápida possibilita a preservação da integridade de grande número de células, possivelmente em virtude da prevenção da formação de pequenos cristais de gelo intracelulares que ocorre durante a recristalização (WATSON, 1995; SONGSASEN e LEIBO, 1997; HOLT, 2000).

A redução na porcentagem de espermatozóides ovinos viáveis submetidos a criopreservação está também diretamente relacionada ao aumento da desnaturação da cromatina. É provável que danos à estrutura do DNA ocorridos durante o procedimento de criopreservação sejam responsáveis pela baixa taxa de fertilidade do sêmen ovino (SALAMON e MAXWELL, 1995; PERIS et al., 2004) e humano (BENCHAIB et al., 2003), quando comparados ao sêmen fresco. Além disso, alterações na mitocôndria durante a refrigeração a 5 °C foram descritas como mudanças estruturais que incluem condensação e perda do material mitocondrial (JONES e MANN, 1977), com mudanças na forma da mitocôndria (WOOLLEY e RICHARDSON, 1978). Estudos mostram que espermatozóides submetidos à congelação apresentaram grandes cristais de gelo nas mitocôndrias e perdas de proteínas após a descongelação (QUINN et al., 1980), provavelmente prejudicando a produção de adenosinatrifosfato (ATP; WATSON, 1995).

2.2 Composição dos diluidores utilizados na criopreservação

A presença de algumas substâncias adicionadas ao meio diluidor altera as propriedades físicas do processo de congelação da solução (KATKOV et al., 1994; SILVA et al., 2007), bem como promovem alguma proteção aos espermatozóides durante a refrigeração ou congelação (HOLT, 2000). Para Salamon e Maxwell (1995), independente da espécie, os diluentes usados para congelação de sêmen devem possuir nutrientes como fontes de energia para o metabolismo espermático (frutose, glicose, lactose), substância tampão contra mudanças deletérias de pH e osmolaridade, e concentração fisiológica de eletrólitos (TRIS - ácido cítrico, TES – citrato, glicina). A utilização do TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano)

proporciona melhores percentuais de motilidade, enquanto que a Gema de ovo e o Leite previnem o choque térmico, e o crioprotetor (glicerol, etilenoglicol, DMSO) reduz danos estruturais aos espermatozóides resultantes da congelação e da descongelação (ENGLAND e PLUMMER, 1993).

A gema de ovo atua como crioprotetor não-penetrante, protegendo os espermatozóides contra danos causados durante o choque térmico (HOLT, 2000), o que pode ocorrer devido ao fato das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) se aderirem à membrana plasmática durante o processo de congelação, resultando na manutenção da pressão coloidal do meio diluente e estabilizando a membrana espermática durante a congelação/dcongelação (MOUSSA et al., 2002). De acordo com Holt (2000), a gema de ovo previne alterações na motilidade durante a redução da temperatura de -20 °C em espermatozóides de carneiros, enquanto Fiser et al. (1982) observaram que a associação entre gema de ovo e açúcar proporcionou melhores percentuais de motilidade e vigor à célula espermática ovina incubada a 39 °C durante 60 minutos.

Os agentes crioprotetores possuem estruturas que promovem ligações de hidrogênio com a molécula de água, criando ambiente menos nocivo para as células espermáticas, interagindo direta ou indiretamente com a membrana celular e estabilizando a estrutura do complexo terciário água, lipídio e proteína (PARKS e GRAHAM, 1992; SONGSASEN e LEIBO, 1997). Estas ligações de hidrogênio também promovem estabilização da conformação das proteínas quaternárias da membrana contra a desidratação (KATKOV et al., 1994). O glicerol é o crioprotetor penetrante mais utilizado nos meios de congelação de sêmen, porém sua toxicidade pode causar desnaturação das proteínas, alteração de interações da actina e indução da liberação das proteínas na membrana (MEDEIROS, 2003). Também são observadas mudanças nos eventos citoplasmáticos em virtude de aumentar a viscosidade intracelular, bem como ocorrer alteração na polimerização da tubulina, na associação dos microtúbulos, no balanço bioenergético, na membrana plasmática, no glicocálix e nas proteínas superficiais da célula espermática (HAMMERSTEDT et al., 1990).

Segundo Ollero et al. (1998), a capacidade fertilizante é um dramático desafio para a sobrevivência da célula espermática após a refrigeração, congelação e descongelação, devido às perdas de viabilidade, funcionalidade e motilidade, o que pode ser prevenido pelo uso do diluente Fiser acrescido de gema de ovo e glicerol e suplementado ou não com aminoácido (Prolina, Serina, Glicina), albumina e vitamina E. Por outro lado, de acordo com Paulenz et al. (2002), o Tris-Gema proporciona melhores percentuais de motilidade espermática durante 30 horas de refrigeração do sêmen ovino.

2.3 Espécies de oxigênio reativas

O radical livre é conceituado como qualquer espécie química, átomo, íon ou molécula que contém um número de elétrons não pareados na camada de valência, apresentando alta reatividade e instabilidade (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Para Brouwers et al. (2005), existem compostos igualmente tão reativos quanto os radicais livres, mas que não possuem elétron não-pareado na última camada e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres. Estas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies de oxigênio reativas (ROS) ou espécies de nitrogênio reativas (RNS) e incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o cátion nitrosonium (NO^+), o ânion nitroxila (NO^-) e o peroxinitrito ($ONOO^-$). Estima-se que entre 2 e 5% do oxigênio utilizado pela mitocôndria seja convertido em ROS (URSO e CLARKSON, 2003).

As ROS/RNS possuem vida-média muito curta devido à maior possibilidade de extrair elétrons de outras moléculas e formar outras substâncias reativas (PEREIRA, 1996), as quais são altamente lesivas, promovendo trocas e modificações na seqüência de bases de DNA, causando apoptose celular, alterações de cadeias protéicas e LPO, com conseqüente prejuízo do transporte intracelular (LEITE e SARNI, 2003), além de inativação dos canais de íons membranares, causando elevação de cálcio e ferro ionizados, o que pode culminar com o efeito citotóxico (LEITE e SARNI, 2003; SOUZA Jr. et al., 2005; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Estudos mostram que grande porcentual do oxigênio consumido pela célula é utilizado na mitocôndria para a fosforilação oxidativa, onde é reduzido à água. Entretanto, uma pequena fração de oxigênio pode ser liberada da cadeia transportadora de elétrons e produzir ROS (Di MEO e VENDITTI, 2001; URSO e CLARKSON, 2003). Atualmente, estudos têm demonstrado que os espermatozóides são capazes de produzir quantidades controladas de ROS endógeno, com o objetivo de induzir a capacitação espermática e a reação do acrossoma, promovendo sua habilidade fertilizante (De LAMIRANDE e GAGNON, 1995; RIVLIN et al., 2004). Todavia, quando a produção de ROS é excessiva, torna-se prejudicial à fisiologia espermática, em virtude de reduzir a motilidade espermática, a capacidade de fusão dos gametas e a fertilidade (GUERRA et al., 2004), através da interação com lipídios da membrana, proteínas e DNA mitocondrial e nuclear (HELLSTROM et al., 1994).

As células espermáticas são altamente susceptíveis aos danos causados por ROS devido às elevadas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e às baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu reduzido

citoplasma (AITKEN, 1999; AGARWAL et al., 2004). As ROS atacam os ácidos graxos poliinsaturados da membrana plasmática provocando danos peroxidativos (SIKKA et al., 1982), determinando perda da função da membrana (AGARWAL e SALEH, 2002; AGARWAL e SAID, 2003) e da integridade do DNA (AITKEN, 1999; AITKEN e KRAUSZ, 2001; SALEH et al., 2002; MOUSTAFA et al., 2004). Espermatozóides pós-descongelamento apresentam elevada produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) devido à ação das oxigenases, enzimas neo-sintetizadas envolvidas nos processos lesivos ou tóxicos celulares (SHANNON e CURSON, 1972), cuja consequência imediata é a LPO devido à desestruturação dos ácidos graxos poliinsaturados constituintes da membrana plasmática e a redução da motilidade (TAYLOR, 2001), além da perda oxidativa do DNA mitocondrial e da estrutura da membrana, o que pode afetar as taxas de fertilidade (CUMMINS et al., 1994).

Na LPO, inicialmente, o radical hidroxila captura um átomo de hidrogênio de um carbono metileno da cadeia polialquil do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular, formando o radical lipídico (SOUZA Jr. et al., 2005). O fato do O_2 ser sete a oito vezes mais solúvel em meio não polar do que em meio polar permite que as membranas biológicas apresentem elevada concentração de O_2 na região hidrofóbica medial, resultando em maior dano aos ácidos graxos poliinsaturados, determinando maior susceptibilidade à desestruturação provocada pela LPO (VANCINNI et al., 2005). Assim, um ácido graxo com elétron desemparelhado reage com o O_2 gerando o radical peroxila, produto altamente reativo que pode se combinar com outros radicais semelhantes, alterando as proteínas de membrana (GATÉ et al., 1999).

O estresse oxidativo ocorre como consequência da elevada concentração de ROS resultante de hiperprodução ou de diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante (DRÖGE, 2002; URSO e CLARKSON, 2003), onde a grande quantidade de fosfolípidios presente nas membranas celulares é rapidamente afetada pela elevada produção de ROS. Estes radicais reagem com ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidios para formar lipoperóxidos que compõem a cascata de reações degenerativas dos lípidios, causando perda na fluidez da membrana espermática, prejudicando sua fisiologia e reduzindo sua motilidade (De LAMIRANDE et al., 1997; FORD, 2004).

Por outro lado, o estresse oxidativo pode também estar relacionado com alterações características do sêmen, como oligozoospermia grave e teratozoospermia. A correlação positiva entre a morfologia espermática e a concentração de enzimas antioxidantes sugere que o consumo de antioxidantes é maior quando ocorre excesso da produção de ROS nos espermatozóides patológicos (CARVALHO et al., 2002). Acredita-se que retenção do

citoplasma residual no espermatozóide humano tenha correlação positiva com a produção de ROS através dos mecanismos mediados pela enzima citosólica glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH). Esta enzima regula a disponibilidade da nicotina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) intracelular e sua excessiva produção está relacionada com os níveis de ROS gerados espontaneamente após a liberação do espermatozóide da cauda do epidídimo (VALLÉ, 2001). Entretanto, se as ROS forem originadas no testículo ou no epidídimo poderão interagir com a membrana plasmática por um período longo, aumentando as possibilidades de danificar os espermatozóides (FORD, 2004).

2.4 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação através da inibição da produção ou dos efeitos deletérios dos radicais livres (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Em condições normais, os mecanismos antioxidativos celulares, presentes em quase todos os tecidos e suas secreções, são responsáveis por inibir a elevada produção de ROS, protegendo as células de danos oxidativos (JONES et al., 1979). Todavia, o controle da concentração das ROS ocorre pela inclusão de antioxidantes ou pelo uso de condições que reduzam a oxidação durante a congelação (AGARWAL et al., 2004). A eficácia do antioxidante depende do tipo e da concentração das ROS/RNS produzidas (PEÑA et al., 2003). Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas falhe na proteção ou mesmo aumente as lesões induzidas em outros sistemas (HALLIWELL, 1990).

Células somáticas contêm antioxidantes dentro de seu citoplasma, porém o espermatozóide perde a maioria de seu citoplasma durante a maturação, faltando, assim, mecanismos endógenos que regulem e realizem as defesas enzimáticas observadas em outros tipos celulares (CARVALHO et al., 2002). Por conseguinte, com o objetivo de reduzir os danos oxidativos causados pela elevada concentração de ROS exógeno, alguns pesquisadores têm adicionado substâncias antioxidantes aos diluentes de sêmen de suínos (PEÑA et al., 2003; ROCA et al., 2004), bovinos (BILODEAU et al., 2001), ovinos (MAXWELL e STOJANOV, 1996; UPRETI et al., 1997), aves (BRÈQUE et al., 2003) e homem (HUGHES et al., 1998; DONNELLY et al., 1999; AGARWAL e SALEH, 2002).

Estudos sobre a regulação da atividade das enzimas antioxidantes destacam a importância das modificações alostéricas ou covalentes sofridas por essas enzimas

(PEREIRA, 1996). Estas modificações devem ser consideradas porque as enzimas antioxidantes são ativadas ou desativadas quando há, respectivamente, presença ou ausência de seus cofatores (metais de transição e selênio) e de seus substratos (YU et al., 2002).

Segundo Aitken (1999), o espermatozóide apresenta um sistema intracelular de defesa antioxidante contra ROS, desempenhado pelos antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e redutase) e não-enzimáticos (ácido ascórbico e α -tocoferol). Entretanto, enzimas antioxidantes intracelulares não conferem proteção total à membrana plasmática que envolve o acrossoma e a cauda, forçando os espermatozóides a suplementarem essa limitada defesa intrínseca com a proteção conferida pelo plasma seminal, o qual contém antioxidantes enzimáticos (ALVAREZ e STOREY, 1989; ZINI et al., 1993), responsáveis em neutralizar a ação do O_2^- e H_2O_2 (CARVALHO et al., 2002; SOUZA Jr. et al., 2005), além de uma variedade de antioxidantes não enzimáticos, como ácido ascórbico, urato, α -tocoferol piruvato, taurina e hipotaurina (ZINI et al., 2000; SALEH e AGARWAL, 2002).

2.4.1 Vitamina C

A vitamina C é o principal antioxidante hidrossolúvel disponível tanto no meio intra quanto no extracelular, e atua eliminando diretamente as ROS/RNS, além de estar envolvido na reciclagem de α -tocoferil em α -tocoferol (BIANCHI e ANTUNES, 1999). O calor, a exposição ao ar e o meio alcalino aceleram a oxidação desta vitamina, especialmente em contato com o ferro, cobre ou enzimas oxidativas (GUILLAND e LEQUEU, 1995). Entretanto, o ácido ascórbico é conhecido por atuar como inibidor de uma grande variedade de ROS (LUCK et al., 1995), o que explica sua habilidade de contrapor, especialmente, ao efeito do H_2O_2 (SIES et al., 1992) nos danos causados ao DNA (AGARWAL et al., 2004).

O ácido ascórbico é necessário também para o metabolismo de vários aminoácidos, além de ser um co-fator muito importante nas reações de hidroxilação, onde o cobre e o ferro devem permanecer reduzidos (ARCHRYA et al., 2003). Para Ferreira (2004), esta vitamina pode ser encontrada em duas formas nos sistemas biológicos: a) reduzida, denominada de ácido ascórbico, e b) oxidada, conhecida como ácido desidroascórbico. Ambas são fisiologicamente ativas e encontradas nos tecidos orgânicos, porém a vitamina C freqüentemente utilizada é o L-ácido ascórbico (Figura 2).

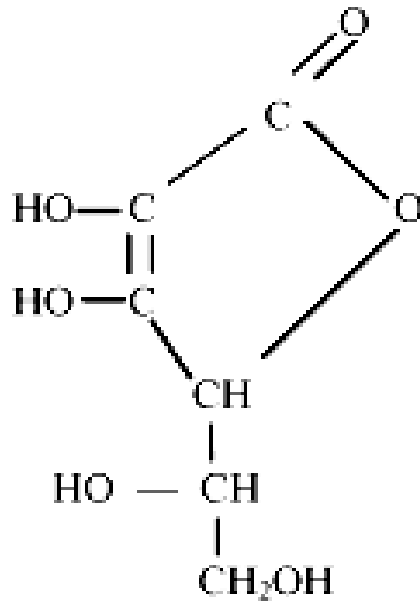


Figura 2. Fórmula estrutural do ácido L-ascórbico.
(Fonte: FERREIRA, 2004).

O córtex adrenal contém grandes quantidades de vitamina C que se esgotam rapidamente quando a glândula é estimulada pelo hormônio adrenocorticotrófico. A razão para este evento é obscura, porém sabe-se que a esteroidogênese envolve várias sínteses redutivas (MURRAY et al., 1994). No entanto, apesar de seu papel na reprodução ainda ser obscuro, recentes estudos mostram que o ácido ascórbico atua na esteroidogênese (CHINOY et al., 1986; LUCK et al., 1995) e na proteção espermática (LUCK et al., 1995). Thiele et al. (1995) sugeriram, em humano, haver correlação negativa entre as concentrações de ácido ascórbico e os percentuais de patologias espermáticas.

Chinoy et al. (1986), estudando a fisiologia reprodutiva de porcos da Guiné submetidos à dieta com supressão de ácido ascórbico, observaram histologicamente redução do número total de células espermáticas, queda nos percentuais de motilidade, além de degeneração testicular aguda. Fato que pode ser atribuído à diminuição das concentrações dos andrógenos testiculares e que pode ser manifestado através de parâmetros de subfertilidade. Song et al. (2004) sugeriram a suplementação de vitamina C na dieta de homens inférteis, ao constatarem correlação negativa entre fragmentação de DNA e a reduzida concentração de ácido ascórbico no plasma seminal de homens inférteis.

Por outro lado na espécie eqüina, o efeito da catalase e do ácido ascórbico na motilidade e na integridade da membrana de espermatozóide diluído em leite desnatado ou

glicina e submetido à refrigeração foi avaliado por Aurich et al. (1997). A adição de ácido ascórbico ao diluente constituído por Leite desnatado-Glicina resultou no aumento de espermatozóides com membranas íntegras, enquanto que a catalase não exerceu nenhuma influência nos parâmetros avaliados. Resultados contrários foram relatados por Ball et al. (2001), ao avaliarem o efeito da catalase, do hidroxitolueno butilato (BHT), da vitamina E, da vitamina C, do Trolox e da BSA na manutenção da motilidade de espermatozóides eqüinos submetidos à refrigeração a 5 °C.

Sánchez-Partida et al. (1997) estudaram o efeito de compostos do plasma seminal (taurina, hipotaurina e inositol) e do ácido ascórbico sob a motilidade e a fertilidade do sêmen ovino criopreservado com Tris-Gema (com e sem glicerol), onde observaram que a taurina exerceu efeito positivo apenas na motilidade espermática (com e sem glicerol). Em touros, a adição de glutathione, superóxido dismutase, ácido ascórbico e hipotaurina ao diluente à base de leite integral e glicerol não exerceram efeito benéfico na motilidade ou na fertilidade, possivelmente devido à presença da caseína (FOOTE et al., 2002)

Testando o efeito do acetato de α -tocoferol glutathione peroxidase, aromex, resveratrol e da associação entre resveratrol + vitamina E e resveratrol + aromex, Sarlós et al. (2002) observaram que a adição de antioxidante ao sêmen prolonga o período de conservação da célula espermática, melhora a motilidade do espermatozóide e reduz os danos celulares. Enquanto Archarya et al. (2003) reportaram, em ratos suíços, o papel protetor da vitamina C (10 mg/Kg) no combate à oxidação induzida por ferro, quando foram obtidos declínio dos percentuais de células com aberrações cromossômicas e de patologias espermáticas, além de manter a concentração espermática dentro dos padrões fisiológicos.

Foi observado por Sönmez e Demirci (2004) que o ácido ascórbico (0,5; 1 e 2 mg/mL) promove efeito negativo na congelabilidade de sêmen ovino diluído com Tris-gema contendo diferentes proporções de glicerol (3, 5 e 7%) sobre a motilidade, a integridade acrossomal e as patologias espermáticas. E Pontbriand et al. (1989) relataram que o ácido ascórbico não preveniu os efeitos negativos do glicerol sobre os parâmetros de motilidade e integridade acrossomal em carneiros.

2.4.2 Vitamina E

A vitamina E pertence a um grupo de substâncias antioxidantes lipossolúveis (tocoferóis e tocotrienóis) encontrados nos óleos vegetais e, na natureza, apresenta-se sob

quatro formas α , β , γ e δ -tocoferol. O α -tocoferol é o antioxidante amplamente distribuído nos sistemas biológicos (BIANCHI e ANTUNES, 1999), e sua ação foi primeiramente descrita em 1922 por Evaris e Bishop, que demonstraram ser uma substância lipossolúvel e essencial para a reprodução de ratos (HALLIWELL, 1990).

Esta vitamina constitui-se no maior, senão o único antioxidante de membrana, impedindo ou minimizando os danos provocados pelas ROS através da redução da propagação de reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas, neutralizando O_2^- e H_2O_2 (BUETTNER, 1993). O α -tocoferol e seus análogos têm papel fundamental na regulação e no desenvolvimento da hiperativação e da capacitação espermática, possivelmente ativando a ação da fosfolipase A_2 (SHARMA e AGARWAL, 1996). Sua deficiência provavelmente promove redução das concentrações de ácidos graxos poliinsaturados, o que pode culminar com a esterilidade em diversas espécies mamíferas decorrente da queda na motilidade espermática (MASON et al., 1933 citado por INFANTE, 1999).

Mesmo as baixas concentrações do α -tocoferol no plasma seminal são capazes de proteger as células espermáticas de mamíferos de estresse oxidativo através da regeneração deste antioxidante pelo ácido ascórbico (KAGAN et al., 1992). Entretanto, sua concentração na membrana plasmática dos espermatozóides é muito baixa, geralmente entre 0,05 - 0,1 nmol/mg de proteína, ou seja, menos de 1 para cada 1000-2000 fosfolipídios das membranas (SIKKA, 2004). Porém, durante a ação antioxidante, o α -tocoferol é consumido e convertido em forma de radical, modificando a estrutura do fosfolipídio da membrana (ALMEIDA e BALL, 2005).

O Trolox (6-hidroxil-2,5,7,8 tetrametil-croman-2-ácido carboxílico), análogo hidrossolúvel do α -tocoferol, é constituído por cadeia linear saturada da vitamina-E (Figura 3) que foi substituída por um hidrogênio, dando maior solubilidade à molécula na presença de água (HALLIWELL, 2000). Esta substância destaca-se por ser um potente antioxidante atuando no combate de alterações fisiopatológicas do metabolismo, como por exemplo, aterosclerose, catarata, câncer, envelhecimento precoce e outros processos degenerativos (MAJD et al., 2003), bem como na prevenção dos efeitos citotóxicos da LPO e da apoptose induzida pelo citocromo P 450 (EUM e LEE, 2004).

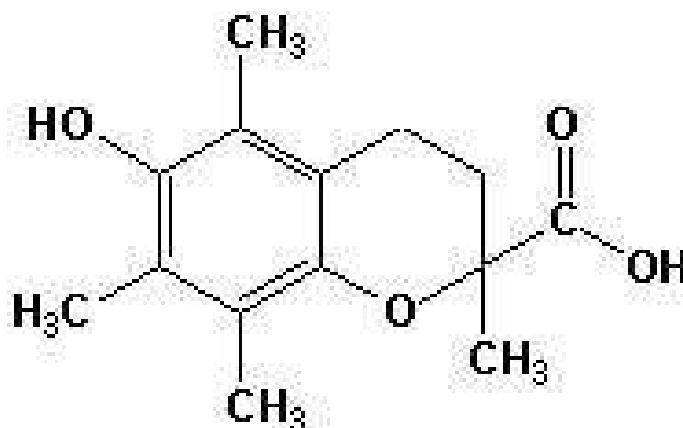


Figura 3. Fórmula estrutural do Trolox (6- hidroxil- 2, 5,7,8 tetrametil-croman-2 ácido carboxílico).
(Fonte: CACHICHI, 2002).

Além de ser capaz de prevenir o estresse oxidativo causado pelo sistema composto ácido ascórbico/ Fe^{2+} e pelo radical peroxil (SÀNCHEZ-MORENO, 2002), o Trolox é capaz de reduzir o efeito citotóxico causado pela oxidação da metionina (SATO et al., 1997) e suportar a temperatura ambiente (SÀNCHEZ-MORENO, 2002). Porém, na presença do íon cobre, esta substância pode atuar como pró-oxidante (ROMAY et al., 1996 citado por CACHICHI, 2002).

Estudos *in vitro* têm reportado o efeito positivo da vitamina E na proteção da morfologia e da motilidade espermática (AGARWAL et al., 2004). A congelação/descongelação está associada à redução da motilidade espermática induzida pelo estresse oxidativo (HOLT, 2000) e a adição de vitamina E (10.000 $\mu\text{mol/L}$) ao diluente é capaz de preservar a motilidade (ASKARI et al., 1994). Todavia, Upreti et al. (1997) não constataram efeito benéfico da adição de vitamina E, butilato de hidroxianisone (BHA), n-propilgalato, mesilato de deferoxamina e catalase ao diluidor comercial (RSD-1) na motilidade do espermatozóide de carneiros incubados a 38 °C, o que provavelmente pode ser justificado pela presença de antioxidante no diluente utilizado, culminando com o efeito pró-oxidante.

A administração exógena de Trolox em suínos foi dependente da dose e da fração do ejaculado, o que determinou significativo aumento na motilidade, na atividade mitocondrial e na viabilidade espermática pós-descongelação, embora esse efeito tenha sido mais evidente na

fração II do ejaculado de suínos para qualquer concentração utilizada desse antioxidante (PEÑA et al., 2003).

2.4.3 Associação de vitamina C e α -tocorefol

O efeito cooperativo entre as vitaminas C e o α -tocorefol é frequentemente mencionado na literatura, o que pode ser explicado através da geração de tocoferol a partir dos radicais tocoferil, produto da interação de tocoferol e ROS (BUETNER, 1993), mostrando que esta interação é eficaz na inibição de LPO (GEY, 1998). Segundo Beconi et al. (1993), quando adicionadas ao sêmen bovino, as vitaminas C e E proporcionaram maior porcentual de espermatozóides com acrossoma e mitocôndrias intactos. Contrariamente, Hughes et al. (1998) reportaram que a vitamina C e o α -tocorefol, quando adicionados separadamente, protegem contra danos de DNA, mas quando associados determinam efeitos negativos no sêmen humano. No entanto, este fato pode ter sido acarretado pelas condições de armazenamento (5 °C vs 19 °C), bem como pela composição da membrana ou das concentrações de antioxidantes e enzimas inibidoras encontradas nos sêmen de diferentes espécies (BALL e VO, 2002).

Para Donnelly et al. (1999), a associação entre ascorbato (300 e 600 μ M) e Trolox (40 e 60 μ M) é eficaz em contrapor os danos causados pelo H_2O_2 à integridade de DNA de espermatozóides humanos incubados durante 3 horas. Dessa forma, nestes espermatozóides, tanto ácido ascórbico quanto Trolox aumentam a integridade de DNA basal, em virtude de reduzir a produção de radicais livres e os danos causados por sua elevada concentração (FRAGA et al., 1991; GEY, 1998; DONNELLY et al., 1999).

Por outro lado, Yousef et al. (2003) estudaram, em coelhos adultos, o efeito exógeno da suplementação com ácido ascórbico (1,5 g/L) e vitamina E (1,0 g/L), isolados ou associados, sobre as características espermáticas, LPO e as enzimas do plasma seminal (aminotransferase, alaminotransferase e lactato desidrogenase), quando constataram que estes antioxidantes, isolados ou em combinação, promovem redução da produção de ROS e que a vitamina E preserva a qualidade espermática.

A adição de vitamina C (300 e 600 μ mol/L) e de vitamina E (40 e 60 μ mol/L) ao sêmen humano foi significativa para a redução dos danos ao DNA causados pelos efeitos do H_2O_2 (AGARWAL et al., 2004). Guerra et al. (2005), estudando o efeito de vitamina C e

Trolox em amostras de sêmen ovino submetidas à diluição com Tris-Gema e coloração com Hoeschst 33342, observaram que a adição de vitamina C e Trolox nas concentrações de 2.400 μM e 600 μM , respectivamente, determina maior porcentual de gametas com motilidade progressiva ($24,3 \pm 8,8$ % - vitamina C; $22,3 \pm 4,63$ % - Trolox) e reduz o efeito negativo da taxa de diluição, coloração com Hoechst 33342 e criopreservação.

EXPERIMENTOS

3.1 Efeito do tempo de incubação pós-descongelação sobre a viabilidade de espermatozóides ovinos criopreservados com Tris-Gema suplementado com vitamina C e Trolox

Effect of the incubation time after thawing on the viability of ram sperm cryopreserved in Tris-yolk diluent supplemented with vitamin C and Trolox

**PEIXOTO, A. L. V. de A.¹; MONTEIRO Jr, P. L. J.¹; CÂMARA, D. R.²;
VALENÇA, R. M. B.¹; SILVA, K. M. G.¹; GUERRA, M. M. P.¹**

¹*Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;*

²*Curso de Doutorado em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia- RENORBIO*

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito do tempo de incubação pós-descongelação sobre a viabilidade de espermatozóides ovinos criopreservados em diluente Tris-Gema suplementado com vitamina C e Trolox. Amostras de sêmen de quatro reprodutores ovinos da raça Santa Inês foram colhidas com auxílio de vagina artificial e, após efetuadas as avaliações (motilidade, vigor), procedeu-se a formação do *pool* de amostras, o qual foi submetido ao procedimento de diluição com Tris-Gema acrescido de antioxidantes de acordo com o grupo experimental: G1) Tris-Gema (Grupo controle); G2) Tris-Gema + 600 µM/L de vitamina C; G3) Tris-Gema + 60 µM/L de Trolox e G4) Tris-Gema + 600 µM/L de vitamina C + 60 µM/L de Trolox. Para a congelação, as palhetas (0,25 mL) contendo 100×10^6 espermatozóides foram colocadas em máquina de congelação utilizando a curva rápida (- 0,5 °C/ min, de 25 °C a 5 °C, e a - 12,5 °C/ min, de 5 °C a -120 °C) e, após atingir -120 °C, as palhetas foram imersas e armazenadas em nitrogênio líquido. Após descongelação a 37 °C durante 30 segundos, as amostras de sêmen foram transferidas para tubos de ensaio previamente aquecidos e mantidas nesta temperatura, onde foram analisadas a 0, 30 e 60 min de incubação quanto a motilidade, vigor, integridade de acrossoma e de DNA, e estresse oxidativo. Constataram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de avaliação (0, 30 e 60 min) para os parâmetros de integridade de acrossoma e estresse oxidativo. Todavia, não foi constatada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos tratados com vitamina C e

Trolox e o grupo controle. Conclui-se que o tempo de incubação interfere negativamente na viabilidade *in vitro* das células espermáticas independente da adição de vitamina C e Trolox.

PALAVRAS-CHAVES: Viabilidade espermática, tempo de incubação, antioxidantes.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the incubation time after thawing on the viability of ram sperm cryopreserved in Tris-yolk diluent supplemented with vitamin C and Trolox. Semen samples of four Santa Ines rams were harvested with artificial vagina and evaluated according to motility and vigor. The *pool* of semen samples was submitted to dilution with Tris-yolk supplemented with antioxidant substances in accordance with the experimental group: G1) Tris-yolk (Control Group); G2) Tris-yolk + 600 μ M/L of vitamin C; G3) Tris-yolk + 60 μ M/L of Trolox and G4) Tris-yolk + 600 μ M/L of vitamin C + 60 μ M/L of Trolox. To cryopreservation, the straws (0.25 mL) with 100×10^6 spermatozoa were transferred to freezing machine using fast curve (- 0.5 °C/minute, of 25 °C to 5 °C, and - 12.5 °C/minute, of 5 °C to -120 °C) and after to reach -120 °C the straws were immersed and stored in liquid nitrogen (-196 °C). After thawing at 37 °C during 30 seconds, the semen samples were transferred to dry test tubes previously warmed and kept in this temperature, where they were analyzed at 0, 30 and 60 minutes of incubation according to motility, acrosome and DNA integrity and oxidative stress. It was evidenced significant difference ($p < 0.05$) among evaluation times (0, 30 and 60 min) to motility, vigor, acrosome and DNA integrity and oxidative stress. However, there was no statistical difference ($p > 0.05$) among vitamin C and Trolox groups with Control group. It is concluded that the incubation time intervenes negatively on *in vitro* viability of the sperm cells independent of the vitamin C and Trolox addition.

KEYWORDS: Sperm viability, time incubation, antioxidants.

1 INTRODUÇÃO

Os processos de refrigeração, congelação e descongelação causam danos à membrana, acrossoma, motilidade progressiva e metabolismo celular para produção de energia,

prejudicando o tempo de sobrevivência e a capacidade fecundante dos espermatozóides no sistema reprodutor feminino (WATSON, 2000). Após o procedimento de descongelamento espermática ocorre aumento na produção de espécies de oxigênio reativas (ROS) decorrente da redução univalente de oxigênio, como por exemplo, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio (BAUMBER et al., 2003ab) ou das oxigenases, enzimas neo-sintetizadas envolvidas nos processos lesivos ou tóxicos celulares (SHANNON e CURSON, 1972), resultando em peroxidação lipídica (LPO) que acarreta danos estruturais ao acrossoma, além de redução da motilidade (TAYLOR, 2001).

A avaliação da longevidade dos espermatozóides através de repetidas observações de motilidade pós-descongelamento em tempos variados, conhecida como teste de termorresistência (TTR) espermática (PEÑA et al., 2003), associada às avaliações de sua integridade morfológica (WATSON, 1995), podem ser considerados bons indicadores da funcionalidade da célula espermática (PEÑA et al., 2003).

Os espermatozóides são vulneráveis aos efeitos tóxicos do estresse oxidativo ocorridos durante a congelação/descongelamento (BROUWERS et al., 2005), em virtude de elevadas concentrações de ROS prejudicarem a motilidade, a viabilidade e a função espermática através da interação com lipídeos da membrana, proteínas, DNA mitocondrial e nuclear (SILVA et al., 2007). Em condições normais, os mecanismos antioxidativos celulares são responsáveis por inibir a elevada produção de ROS, protegendo as células de danos oxidativos (JONES et al., 1979). No entanto, procedimentos laboratoriais como diluição (CATT et al., 1997), centrifugação (TWIGG et al., 1998), refrigeração (MAXWELL e WATSON, 1996) e congelação (BALL et al., 2001) determinam aumento na produção de ROS espermático e substâncias antioxidantes têm sido utilizadas para prevenir a produção ou os efeitos deletérios do estresse oxidativo causado pela excessiva quantidade de oxidantes. Todavia, a ação dos antioxidantes depende do tipo e da concentração das ROS produzidas (BIANCHI e ANTUNES, 1999), além do tempo de incubação da célula espermática pós-descongelamento (PONTBRIAND et al., 1989).

O ácido ascórbico atua como inibidor de uma grande variedade de ROS, o que explica sua habilidade de contrapor ao efeito do H_2O_2 nos danos causados ao DNA dessa célula (SIES et al., 1992). O α -tocoferol e seu análogo hidrossolúvel, o Trolox, inibem as reações oxidativas e neutralizam os efeitos deletérios dos radicais peroxilas (SILVA et al., 2007). Por conseguinte, tem sido relatado que o ácido ascórbico e o α -tocoferol agem sinergicamente com o objetivo de proteger a peroxidação lipídica da célula, reduzindo a produção de ROS induzida pelo H_2O_2 (DONNELLY et al., 1999).

O tempo de sobrevivência e a viabilidade espermática pós-descongelamento é um dos desafios para o meio científico, permitindo estudar alternativas para a congelamento do sêmen. Assim, este estudo objetivou avaliar o efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados em diluente Tris-Gema suplementado com vitamina C e Trolox.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados quatro reprodutores da raça Santa Inês, com idade entre 3 a 5 anos, criados em sistema extensivo, no município de Rio Largo-AL, alimentados em pasto formado por capim *Tifton* e *Brachiaria sp.*, além de serem fornecidos sal mineral e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a exame andrológico constituído de avaliação clínica geral e do sistema reprodutor, sendo selecionados apenas os animais considerados aptos à reprodução.

2.2 Colheita e avaliação do sêmen

Um total de quatro ejaculados/macho foi colhido semanalmente (n=16) através do método de vagina artificial, com auxílio de uma fêmea manequim. Em seguida, o sêmen foi mantido em banho-maria (37 °C) para avaliação macroscópica (volume, aspecto, pH) e microscópica (motilidade progressiva, vigor). As células espermáticas foram avaliadas antes e após a congelamento quanto a motilidade progressiva (MP), vigor, integridade de acrossoma, integridade do DNA e estresse oxidativo.

2.2.1 Motilidade progressiva e vigor espermático

Uma alíquota de 10 µL de sêmen foi depositada sobre lâmina previamente aquecida a 37 °C e conduzida ao microscópio óptico (Optech, Germany), onde se avaliou MP (0-100 %) e vigor espermático (0-5). Em seguida, realizou-se o *pool* de todas as amostras e procedeu-se

avaliação de motilidade, vigor e concentração espermática, sendo submetidas à congelação amostras que apresentaram $MP \geq 70\%$ e $vigor \geq 3$ (CBRA, 1996).

2.2.2 Integridade do acrossoma

A integridade de acrossoma foi avaliada diluindo 10 μL de sêmen em 990 μL de solução Tris (3,605 g Tris, 2,024 g Ácido Cítrico, 1,488 g Frutose, q.s.p. 100 mL, pH 6,8), a uma concentração final de 1 a 2 milhões de células/mL. A seguir, retirou-se alíquota de 10 μL dessa diluição para confecção das lâminas, as quais foram armazenadas a 4 °C, protegidas da luz e analisadas no prazo de duas semanas. As lâminas foram coradas no momento da análise através da técnica de coloração *FITC*-conjugada ao *Peanut* aglutinina (*FITC*-PNA, ROTH et al., 1998), onde 30 μL de solução de PNA (20 μL PNA + 480 μL PBS) foi depositada no centro da lâmina e efetuada a homogeneização da amostra, a fim de cobrir grande extensão da lâmina.

Posteriormente, as lâminas sofreram refrigeração a 4 °C durante 20 min e, após este período, foram lavadas em 50mL de PBS (Fosfato Salino Tamponado) e colocadas no isopor para secagem em temperatura ambiente. Após secagem, alíquotas de 5 μL da solução UCD (5 mg Azida sódica, 0,5 mL PBS, 0,1 % w/v Fenilenediamina/Sigma P6001, 4,5 mL Glicerol, pH 8,0) foram colocadas entre lâmina e lamínula, e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Germany) utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm), quando foram contados 200 espermatozóides/lâmina e classificados em: a) acrossomas intactos (AI), quando se apresentavam corados em verde; b) acrossomas reagidos (AR), quando apresentavam coloração verde mesclada; sem coloração ou apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática.

2.2.3 Integridade do DNA

Para análise da integridade do DNA espermático através da técnica de Laranja de Acridina (EVENSON et al., 1999), alíquota de 10 µL de sêmen foi diluída em 990 µL de solução de TNE (0,15M NaCl; 0,01 M TRIS.HCl; 1mM EDTA.Na₂.2H₂O; q.s.p. 100 mL, pH 7,4), em tubos de microcentrífuga a uma concentração final de 1 a 2 milhões de células/mL, criopreservadas em nitrogênio líquido e armazenadas -196 °C. No momento da análise, as amostras foram descongeladas a 37 °C, e adicionados 200 µL de solução de TNE em tubo de microcentrífuga imersos em gelo. Imediatamente após, foram adicionados 400 µL de solução detergente (0,1 mL Triton X-100; 0,877 g NaCl; 8 mL 1 N HCl), nos respectivos tubos a 5 °C, a fim de induzir a desnaturação do DNA.

Após 30 segundos, adicionou-se 600 µL da solução de Laranja de Acridina (Polysciences, USA) tamponada (0,1M ácido cítrico; 0,2 M fosfato de sódio; 0,15 M NaCl e 1mM EDTA em pH 6,0). Em seguida, a amostra foi homogeneizada e alíquotas de 5 µL dessa solução foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Germany), utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm). Um total de 200 espermatozóides/lâmina foi avaliado e classificado como: a) DNA de espermatozóides com estruturas de cromatina anormal apresentavam a fluorescência vermelha e b) DNA de espermatozóides com estruturas de cromatina normal apresentavam fluorescência verde média, no qual reflete o conteúdo de DNA e/ou o grau de condensação da cromatina espermática.

2.2.4 Estresse oxidativo

As amostras foram submetidas ao teste de Nitroblue Tetrazolium (NBT; SALEH e AGARWAL, 2002), para identificação da presença de estresse oxidativo espermático, onde inicialmente foram diluídas (1:1; v:v) em solução de 10% de NBT (Sigma, USA) e incubadas durante 30 min à temperatura de 37 °C. Posteriormente, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente durante 30 min e, em seguida, centrifugadas a 250 x G (durante 5 min). Imediatamente após, o pellet foi diluído em solução Tris (3,605 g Tris, 2,024 g Ácido Cítrico, 1,488 g Frutose, q.s.p. 100 mL, pH 6,8) e efetuado o esfregaço. Após secagem à temperatura ambiente, 200 espermatozóides/lâmina foram contados em microscópio de contraste de fase

(100X; Olympus, Germany), sob óleo de imersão, e avaliados quanto ao depósito de formazana na célula: a) Espermatozóide portador de estresse oxidativo, quando identificada presença de formazana na peça intermediária e/ou cabeça espermática, e b) célula espermática sem estresse oxidativo, quando não foi identificada formazana na peça intermediária e/ou cabeça espermática.

2.2.5 Taxa de degradação da motilidade

A análise da perda de motilidade promovida pela incubação foi estimada pela taxa de degradação da motilidade (TDM) entre as médias obtidas imediatamente após a descongelação (motilidade inicial, MI) e a motilidade após 60 min de incubação a 37 °C (Motilidade Final, MF), utilizando a equação $TDM = (MI - MF \times 100) \times MI^{-1}$ descrita por Maia (2006).

2.3 Diluição e congelamento do sêmen

Após colheita e análise macro e microscópica, o *pool* de amostras de sêmen foi submetido ao procedimento de diluição com Tris-Gema (Nutricel, Brasil) acrescido de substâncias antioxidantes de acordo com grupo experimental, seguindo a ordem aleatória de congelamento: G1) Tris-Gema (Grupo controle); G2) Tris-Gema + 600 µM/L de vitamina C (Sigma, USA); G3) Tris-Gema + 60 µM/L de Trolox (Aldrich, USA) e G4) Tris-Gema + 600 µM/L de vitamina C + 60 µM/L de Trolox. Após diluição, as alíquotas de sêmen contendo 100×10^6 espermatozóides foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e processadas em máquina de congelamento de sêmen (modelo TK 3000, TK Tecnologia em Congelamento Ltda, Brasil), utilizando a curva rápida de congelamento: -0,5 °C/min, de 25 °C a 5 °C, e a - 12,5 °C/min, de 5 °C a -120 °C. Imediatamente após a congelamento, as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C).

2.4 Descongelamento e avaliação in vitro do sêmen

A descongelação do sêmen foi realizada em banho-maria a 37 °C durante 30 segundos e, a seguir, as amostras foram diluídas em solução Tris (3,605 g Tris, 2,024 g Ácido Cítrico, 1,488 g Frutose, q.s.p. 100 mL, pH 6,8) em 1:1; v:v e avaliadas quanto a MP e vigor espermático. Em seguida, o *pool* de cada grupo foi avaliado em triplicata para MP, vigor, integridade de acrossoma e DNA e estresse oxidativo após 0, 30 e 60 min de incubação a 37 °C.

2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software estatístico (SISVAR) através da análise de variância (ANOVA), a fim de avaliar o efeito da vitamina C, Trolox e associação vitamina C e Trolox entre grupos (G1, G2, G3 e G4) em três tempos (0, 30 e 60 min) de incubação pós-descongelação, utilizando teste de Tukey para comparação pareada, com delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial (Grupo x Tempo) em nível de significância de 5% sobre a viabilidade pós-descongelação (motilidade, vigor, integridade de membrana acrossomal e grau de estresse oxidativo) do sêmen ovino criopreservado.

3 RESULTADOS

A análise das amostras *in natura* de sêmen de carneiros Santa Inês, imediatamente após a formação do *pool*, apresentou 90,0±10,0% de MP, 4,5±0,5 de vigor, 94,13±2,3% de células com acrossoma íntegros, 99,0±1,0% de espermatozóides com DNA intactos e 66,0±10,2% de células espermáticas com estresse oxidativo.

Porém, imediatamente após a descongelação (0 min), observou-se que as médias para MP, vigor, integridade de acrossoma e estresse oxidativo variaram (Tabela 1) de 21,7±12,6% (G4, vitamina C + Trolox) a 30,0±10,0% (G1, Controle); 2,8±0,3 (G2, vitamina C; G4, vitamina C + Trolox) a 3,3±0,3 (G2, vitamina C); de 32,8±12,7% (G4, vitamina C + Trolox) a 70,2±11,5% (G1, Controle) e 70,3±2,5 (G2, vitamina C) a 76,8±2,5% (G3, Trolox), respectivamente, sem diferirem entre grupos ($p>0,05$).

Aos 30 min de incubação, a 37 °C em banho-maria, não se observou diferença estatística entre grupos ($p>0,05$), sendo constatadas médias entre 18,3±7,6% (G3, Trolox) a 28,3±5,8% (G2, vitamina C) para MP; 2,7±0,6 (G3, Trolox) a 3,2±0,3 (G1, Controle; G2, vitamina C) para vigor, 26,2±9,9% (G4, vitamina C + Trolox) a 58,8±18,5% (G1, Controle)

para integridade de acrossoma e $76,7 \pm 3,8\%$ (G4, vitamina C + Trolox) a $83,0 \pm 4,3\%$ (G3, Trolox) para estresse oxidativo.

Em contrapartida, aos 60 min de incubação pós-descongelação, obteve-se médias que variaram entre $13,3 \pm 5,8\%$ (G3, Trolox) a $20,0 \pm 5,0\%$ (G1, Controle), $2,2 \pm 0,3$ (G3, Trolox) a $3,3 \pm 0,3$ (G1, Controle), $20,0 \pm 4,8\%$ (G4, vitamina C + Trolox) a $37,8 \pm 11,4\%$ (G2, vitamina C) e $82,2 \pm 6,2\%$ (G2, vitamina C) a $86,8 \pm 4,0\%$ (G3, Trolox) para MP, vigor, integridade acrossomal e estresse oxidativo, respectivamente.

O tempo de incubação interferiu ($p < 0,05$) apenas na integridade acrossomal e no estresse oxidativo. No que se refere à integridade acrossomal observou-se que os resultados obtidos aos 0 min foram superiores ($p < 0,05$) àqueles observados aos 30 e 60 min de incubação pós-descongelação a 37°C . Todavia, os resultados dos grupos experimentais (G1, G2, G3 e G4) obtidos após 30 e 60 min de incubação não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$).

Da mesma forma, o tempo de incubação foi determinante para o aumento do percentual de células portadoras de estresse oxidativo, sendo evidenciados maiores percentuais de espermatozoides com estresse oxidativo após 60 min de incubação. No entanto, foram constatadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos das avaliações realizadas nos tempos 0, 30 e 60 min de incubação pós-descongelação.

Entretanto, independente do período incubação, constatou-se que $99,0 \pm 1,0\%$ dos espermatozoides apresentavam integridade do DNA, em todos os grupos experimentais (G1, G2, G3 e G4) e nos tempos de incubação 0, 30 e 60 min.

A avaliação da taxa de degradação da motilidade (Figura 1), após 60 min de incubação a 37°C , evidenciou médias que variaram de $30,4\%$ (G4, vitamina C e Trolox) a $46,9\%$ (G2, vitamina C), não diferindo entre si ($p > 0,05$).

4 DISCUSSÃO

A sobrevivência espermática pós-descongelação depende da manutenção da integridade da membrana plasmática, do acrossoma, da atividade mitocondrial e dos constituintes nucleares (HOLT, 2000; WATSON, 2000), podendo sofrer interferência dos componentes dos diluidores (MAXWELL e WATSON, 1996), da curva de congelamento (KUMAR et al., 2003), da produção de ROS (SILVA et al., 2007), das concentrações de

antioxidantes (AGARWAL et al., 2004), do protocolo de descongelamento (WATSON, 1995) e do tempo de incubação (ROTA et al., 1997).

A redução das taxas de motilidade observadas neste estudo (Tabela 1; Figura 1) podem ser justificadas pelo fato da congelamento do sêmen provocar alterações estruturais e funcionais das membranas espermáticas (MAXWELL e WATSON, 1996), devido à baixa relação de ácidos graxos saturados/insaturados e menor conteúdo de colesterol existente nos espermatozoides ovinos (NOILES et al., 1995; WATSON, 1995). Por outro lado, ao comparar os resultados do *pool* de amostras do sêmen *in natura* (MP e estresse oxidativo) com os resultados obtidos imediatamente após a descongelamento (0 min), observa-se reduzido percentual de motilidade e o elevado percentual de espermatozoides com estresse oxidativo, sugerindo que os espermatozoides já apresentavam desequilíbrio entre as concentrações de ROS e antioxidantes endógenos (SILVA et al., 2007), o que se intensificou durante a incubação a 37 °C por 60 min, sugerindo que a adição de antioxidantes ao diluente não protegeu a célula espermática dos efeitos da incubação (SÀNCHEZ-PARTIDA et al., 1997).

Entretanto, a composição da membrana ou as concentrações de antioxidantes e enzimas inibidoras encontradas nos sêmen de diferentes espécies (BALL e VO, 2002) são fundamentais para reverter os danos oxidativos das células espermáticas, como mostram Upreti et al. (1997), ao relatarem o efeito negativo da adição de vitamina E, butilato de hidroxianisone (BHA), n-propilgalato, mesilato de deferoxamina e catalase ao diluidor comercial (RSD-1) sobre a motilidade dos espermatozoides de carneiros incubados a 38 °C, possivelmente devido ao efeito pró-oxidante das substâncias utilizadas neste experimento. Dessa forma, o mesmo pode ter ocorrido neste experimento, uma vez que não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados (G2, vitamina C; G3, Trolox; G4, vitamina C + Trolox) e o controle nos parâmetros avaliados (MP, integridade acrossomal, integridade de DNA e estresse oxidativo).

Durante o processo de refrigeração (4 a 5 °C) ocorrem rearranjos de fosfolipídios celulares devido à movimentação entre as camadas lipídicas que, conseqüentemente, alteram a permeabilidade das membranas espermáticas (WATSON, 1995), promovendo o aparecimento de edema e perda da membrana acrossomal (PONTBRIAND et al., 1989), interferindo negativamente na viabilidade espermática pós-descongelamento (WATSON, 2000). Todavia, neste estudo, os resultados de integridade acrossomal imediatamente pós-descongelamento (0 min) evidenciou serem maiores do que após a incubação após 30 e 60 minutos à temperatura de 37 °C, independente da adição de antioxidantes.

Por outro lado, independente do tempo de incubação as concentrações testadas de vitamina C e Trolox não promoveram proteção às membranas acrossomais dos espermatozóides de ovinos, discordando dos resultados obtidos por Beconi et al. (1993), que obtiveram maior porcentual de espermatozóides com acrossoma e mitocôndrias intactas ao adicionarem vitamina C (5mM ascorbato) e E (1 mg/mL acetato de α -tocoferol) ao sêmen bovino. Segundo Sönmez e Demirci (2004), a adição do ácido ascórbico (0,5; 1 e 2 mg/mL) promoveu efeito negativo na congelabilidade do sêmen ovino diluído em Tris-gema contendo diferentes proporções de glicerol (3, 5 e 7%) sobre a integridade acrossomal. Entretanto, este efeito negativo pode ter sido atribuído à associação entre os componentes do diluente Tris-Gema com os antioxidantes utilizados, conforme demonstraram Barnabé e Barnabé (1996) ao constatarem resultados inferiores de motilidade e integridade acrossomal na presença do diluente Tris-Gema, ao estudarem o efeito da adição de heparina (0,8 μ g/mL) e cafeína (6mM) ao sêmen de búfalo em diferentes diluidores.

A redução do metabolismo celular com depleção de ATP ou ocorrência de danos aos elementos do axonema (De LAMIRANDE e GAGNON, 1995) ocorre como consequência do agrupamento protéico causado pela congelação, que pode determinar alterações funcionais nos canais iônicos (HOLT, 2000), interferindo no transporte ativo e na permeabilidade da membrana plasmática localizada na região da cauda (SANTOS et al., 2003). Estas alterações podem ser intensificadas pelo tempo de incubação devido à exposição as ROS produzidas pelo metabolismo espermático (SILVA et al., 2007). Contudo, em virtude dos espermatozóides deste experimento já se apresentarem com o desequilíbrio oxidativo antes de iniciar o processo de congelação, como demonstram os resultados do sêmen *in natura*, estes transtornos celulares provocados pela congelação (0 min pós-descongelação) se intensificaram durante o período de incubação (30 e 60 min), conforme identificado pelo aumento do porcentual de espermatozóides com estresse oxidativo.

A manutenção da integridade do DNA imediatamente pós-descongelação (0 min) e durante a incubação a 37 °C (60 min) pode ter ocorrido devido ao fato do grau de compactação da cromatina espermática proporcionar proteção e manutenção da integridade do DNA, tornando-os mais resistentes às mutações e ao estresse ambiental (PERREAULT et al., 1988). Entretanto, os danos de DNA espermático provavelmente ocorrem devido à quebra da estabilidade cromatínica na presença de estresse oxidativo com produção de H₂O₂ no ambiente testicular (TWIGG et al., 1998) ou durante os processos de congelação/descongelação (HAMAMAH et al., 1990), contrariamente aos resultados

observados nos espermatozoides de ovinos conforme relatado por Peris et al. (2004) que, após descongelar e incubá-los por 3 horas a 38 °C, não detectaram danos ao DNA genômico.

Por conseguinte, com base nos resultados de integridade acrossomal e estresse oxidativo, este estudo permite afirmar que o tempo de incubação interfere na viabilidade *in vitro* das células espermáticas independente da adição de antioxidante.

5 AGRADECIMENTOS

Ao Professor Ricardo Fellippe Figueira da Usina Utinga Leão, por disponibilizar os animais para execução desse estudo e ao Professor MSc. Wellyngton Chaves/UNEAL, pela colaboração nas avaliações estatísticas.

6 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; NALLELA, K.P.; ALLAMANENI, S.S.R.; SAID, T.M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 8, p. 616-627, 2004.
- BALL, B.A.; MEDINA, L.A.V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER; I Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 °C. *Theriogenology*, v. 56, p. 577-569, 2001.
- BALL, B.B.; VO, A.T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY 581/591. *Journal of Andrology*, v. 23, p. 259-269, 2002.
- BARNABÉ, V.H.; BARNABÉ, R.C. Effect of caffeine citrate and heparin on post-thawed motility and on acrosomal cap of buffalo: assay for in vitro fertilization technique. *Bubalus Bubalis*, v. 2, p. 57-60, 1996.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2003a.
- BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 60, p. 1239-1247, 2003b.

- BECONI, M.T.; FRANZIA, C.R.; MOR, N.G.; AFFRANCCHINO, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, v. 40, p. 841-851, 1993.
- BIANCHI, M. de L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BROUWERS, J.F.; SILVA, P.F. N.; GADELLA, B.M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*, v. 63, p. 468-469, 2005.
- CATT, S.L.; SAKKAS, D.; BIZZARO, D.; BIANCHI, P.G. et al. Hoechst staining and exposure to UV laser during flow cytometric sorting does not affect the frequency of detected endogenous DNA nicks in abnormal and normal human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, v. 3, p. 821-825, 1997.
- 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).
- De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Andrology*, v. 13, p. 368-386, 1995.
- DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effect of ascorbate and α -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*, v. 14, n. 5, p. 505-511, 1999.
- EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.J. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.
- HAMAMAH, S.; ROYERE, D.; NICOLLE, J. C.; PAQUIGNON, M. et al. Effects of freezing-thawed on the spermatozoa nucleus: a chromatin cytophometric study in the porcine and human species. *Reproduction, Nutrition and Development*, v. 30, p. 59-64, 1990.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 3-22, 2000.
- JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R.J. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, v. 31, p. 531-537, 1979.

- KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, v. 46, p. 246-253, 2003.
- MAIA, M. da S. *Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), Trolox-C e catalase*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 164 p., 2006, Tese de Doutorado.
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 55-65, 1996.
- NOILES, E.E.; BAILEY, J.L.; STOREY, B.T. Temperature dependence of the water permeability, L_p , of murine sperm shows a discontinuity between 4 and 0 °C. *Cryobiology*, v. 32, p. 220-238, 1995.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTINEZ, H.R. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 85-98, 2003.
- PERIS, S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *Journal of Andrology*, v. 25, p. 224-233, 2004.
- PERREAULT, S.D.; BARBEE, R.R.; SLOTT, V.L. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. *Developmental Biology*, v.125, p. 181-186, 1988.
- PONTBRIAND, D.; HOWARD, J.G.; SCHIEWE, M.C.; STUART, L.D. et al. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrossomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, v. 26, p. 341-354, 1989.
- ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*, v. 47, p. 1093-1101, 1997.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M.; WILT, D.E. et al. Heterologous *in vitro* fertilisation and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 475-482, 1998.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.

- SÀNCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C. Epididimal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 9, p. 689-696, 1997.
- SANTOS, I.W.; LIMA, V.F. M.H.; BINSFIELD, L.C.; RIBEIRO, A.P.C. Congelação do sêmen canino comparando diferentes concentrações de glicerol e diferentes tempos de equilíbrio. *Archives of Veterinary Science*, v. 8, p. 57-62, 2003.
- SHANNON, P.; CURSON, B. Toxic effect and action of dead sperm on diluted semen. *Journal of Dairy Science*, v. 55, p. 615-620, 1972.
- SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A.R. Antioxidant function of vitamins. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 69, p. 7-20, 1992.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B.A.J. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impaires the developmental competence of the embryo after first cleavage. *Theriogenology*, v. 67, p. 609-619, 2007.
- SÖNMEZ, M.; DEMIRCI, E. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, v. 28, p. 893-899, 2004.
- TAYLOR, C.T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 10, p. 189-198, 2001.
- TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, D.S. et al. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Human Reproduction*, v. 13, p. 1429-1436, 1998.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.481-92, 2000.

Tabela 1- Motilidade progressiva (%), vigor (0-5), integridade do acrossoma (%) e estresse oxidativo (%) de espermatozoides de carneiros Santa Inês criopreservados com Tris-Gema acrescido de vitamina C e/ou Trolox, após 0, 30 e 60 min de incubação a 37 °C

Tempo de incubação (min)	Grupos experimentais	MP (M ± DP)	VIGOR (M ± DP)	AI (M ± DP)	SOX (M ± DP)
0	G1	30,0 ±10,0	3,0 ±0,1	70,2 ±11,5 ^A	75,7 ±2,0 ^C
	G2	28,3 ±7,6	2,8 ±0,3	59,8 ±3,8 ^A	70,3 ±2,5 ^C
	G3	21,7 ±2,9	3,3 ±0,3	53,8 ±15,9 ^A	76,8 ±2,5 ^C
	G4	21,7 ±12,6	2,8 ±0,3	32,8 ±12,7 ^A	71,3 ±1,8 ^C
30	G1	26,7 ±2,9	3,2 ±0,3	58,8 ±18,5 ^B	80,5 ±2,2 ^B
	G2	28,3 ±5,8	3,2 ±0,3	48,3 ±11,1 ^B	77,0 ±5,8 ^B
	G3	18,3 ±7,6	2,7 ±0,6	37,3 ±10,6 ^B	83,0 ±4,3 ^B
	G4	20,0 ±5,0	3,0 ±0,1	26,2 ±9,9 ^B	76,7 ±3,8 ^B
60	G1	20,0 ±5,0	3,3 ±0,3	34,2 ±9,8 ^B	85,7 ±3,5 ^A
	G2	15,0 ±5,0	2,7 ±0,8	37,8 ±11,4 ^B	82,2 ±6,2 ^A
	G3	13,3 ±5,8	2,2 ±0,3	36,7 ±9,4 ^B	86,8 ±4,0 ^A
	G4	15,0 ±5,0	2,5 ±0,5	20,0 ±4,8 ^B	83,0 ±3,3 ^A

MP= Motilidade progressiva; AI = acrossomas íntegros; SOX = estresse oxidativo. G1= Tris-Gema; G2 = Tris-Gema + 600 µM/L de vitamina C; G3 = Tris-Gema + 60 µM/L de Trolox; G4 = Tris-Gema + 600 µM/L de vitamina C + 60 µM/L de Trolox; M = média; DP= Desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam p<0,05 entre tempos (0, 30 e 60 min) de incubação pós- descongelção.

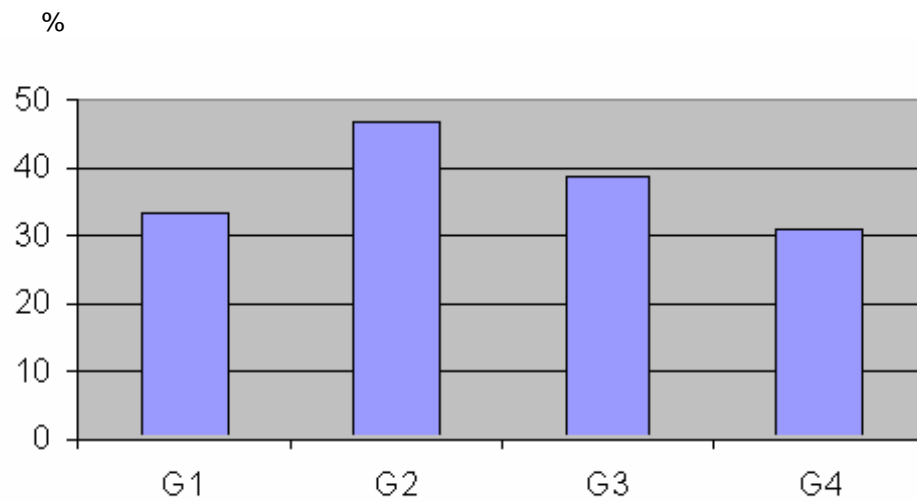


Figura 1 - Taxa de degradação da motilidade espermática de amostras de sêmen ovino criopreservadas em diluente Tris-gema (G1) acrescido de vitamina C (G2), Trolox (G3) e vitamina C + Trolox (G4), após 60 min de incubação em banho-maria a 37 °C.

3.2 Viabilidade *in vitro* do sêmen ovino criopreservado em diluente Tris-gema ou Fiser acrescidos de vitamina C e Trolox utilizando dois métodos de congelação

In vitro viability of the ram semen submitted to cryopreservation on Tris-yolk or Fiser diluents added with vitamin C and Trolox using two methods of freezing

PEIXOTO, A. L. V. de A.¹; MONTEIRO Jr, P. L. J.¹; PEIXOTO, P. C. V. de A.¹;
SILVA, S. V.¹, CARNEIRO, G.F.²; GUERRA, M. M. P.¹

¹ *Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;*

² *Caroatá Genética – Fazenda Lagoa do Cavalo, Gravatá –PE.*

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a viabilidade *in vitro* do sêmen ovino criopreservado em diluente Tris-gema ou Fiser acrescidos de vitamina C e Trolox utilizando dois métodos de congelação, foram utilizados seis reprodutores ovinos submetidos à colheita de sêmen com vagina artificial. Após análise, a *pool* das amostras foi diluído em Tris-gema (Exp. I) e Fiser (Exp. II) e suplementado com antioxidantes: G1) Diluente (Controle); G2) Diluente + 600 µM/L de vitamina C; G3) Diluente + 60 µM/L de Trolox e G4) Diluente + 600 µM/L de vitamina C + 60 µM/L de Trolox. No Exp. I, as palhetas (0,25 mL, 75 x 10⁶ espermatozóides) foram congeladas no método convencional (90 min) e colocadas em nitrogênio líquido por 10 min até atingirem -120 °C. No Exp. II, as palhetas (0,25 mL; 200 x 10⁶ espermatozóides) foram colocadas em máquina de congelação, utilizando duas curvas: Lenta (C1= -0,25 °C/min, de 25 °C a 5 °C, e a -20 °C/min, de 5 °C a -120 °C) e Rápida (C2= -0,5 °C/min, de 25 °C a 5 °C, e a -12,5 °C/min, de 5 °C a -120 °C) e, em seguida, armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C). As amostras de sêmen foram avaliadas imediatamente após a descongelação (0 min) e depois de 60 min de incubação a 37 °C, quanto a motilidade progressiva (MP), vigor, integridade de acrossoma e de DNA e estresse oxidativo. No Exp. I, os percentuais de MP, vigor e integridade de acrossoma diferiram (p<0,05) entre tempos de incubação (0 e 60 min). Imediatamente após a descongelação, os grupos suplementados com antioxidantes apresentaram menores percentuais de células com estresse oxidativo (p<0,05), quando comparado ao grupo controle (G1). No Exp. II observou-se diferença estatística (p<0,05) entre MP, AI e estresse oxidativo quanto ao tempo de incubação (0 e 60 min), assim como entre os grupos Controle (G1) e vitamina C (G2) congelados na curva 2, após 60 min de

incubação, quanto ao porcentual de células portadoras de DNA íntegros. Dessa forma, conclui-se que ao se utilizar o método convencional de congelação de sêmen ovino diluído em Tris-gema, a adição de vitamina C e Trolox proporciona menos estresse oxidativo às células espermáticas imediatamente após a descongelação; Ao se usar o método automatizado de congelação de sêmen ovino diluído em Fiser, deve-se utilizar a curva lenta de refrigeração (0,25 °C/min), sem necessidade da suplementação de vitamina C (600 µM/L) e Trolox (60 µM/L) ao diluente.

PALAVRAS-CHAVES: Temperatura, espermatozóide, viabilidade, ROS.

ABSTRACT

The present study had the objective to evaluate the *in vitro* viability of the ram semen submitted to cryopreservation on Tris-yolk or Fiser diluents added with vitamin C and Trolox using two methods of freezing. It was used six ram to semen harvest with artificial vagina. After analysis of the samples, the *pool* was diluted in Tris-egg yolk (Exp. I) and Fiser (Exp. II) and supplemented with antioxidant substances: G1) Diluent (Control); G2) Diluent + 600µM/L of vitamin C; G3) Diluent + 60µM/L of Trolox and G4) Diluent + 600µM/L of vitamin C + 60µM/L of Trolox. In the Exp. I, the straws (0,25 mL, 75×10^6 spermatozoa) were frozen in the conventional method (90 minutes) and placed in liquid nitrogen during 10 minutes until reaching -120 °C. In the Exp. II, straws (0.25 mL; 200×10^6 spermatozoa) were placed in freezing machine, using two curves: Slow (C1 = -0.25 °C/minute, of 25 °C to 5 °C, and the -20 °C/minute, of 5 °C to -120 °C) and Fast (C2 = -0.5 °C/minute, of 25 °C the 5 °C, and the -12.5 °C/minute, of 5 °C the -120 °C) and, after that, the straws were stored in N₂ liquid (-196 °C). The semen samples were immediately evaluated after thawing (0 min) and after the incubation period at 37 °C (60 minutes), according to progressive motility (MP), vigor, acrosome and DNA integrity and oxidative stress. In the Exp. I, the percentage of MP, vigor and acrosome integrity had statistical difference ($p < 0.05$) between incubation times (0 and 60 min). Immediately after thawing the groups supplemented with antioxidants have lower percentages of cellss with oxidative stress ($p < 0.05$) than control group. In the Exp. II, statistical difference was observed among sperm parameters according to the incubation time (0 and 60 min), as well as between Control (G1) and vitamin C (G2) groups frozen in curve 2, after 60 minutes of incubation on the percentage of sperm with DNA integrity. So, it can be concluded that using the conventional method of cryopreservation of ram semen diluted in

Tris-egg yolk, the vitamin C addition provides less oxidative stress on the spermatozoa after post-thawing; Using the automatized method of cryopreservation of ram semen diluted in Fiser, it should be used the slow curve of refrigeration (0.25 °C/min) without necessity of vitamin C (600µM/L) and Trolox (60µM/L) addition.

KEYWORDS: Temperature, sperm, viability, ROS.

1 INTRODUÇÃO

A congelação causa danos químicos e físicos às membranas extra e intracelular das células espermáticas, os quais são atribuídos a alterações na transição da fase lipídica e/ou aumento na peroxidação (ALVAREZ e STOREY, 1992), devido a mudanças de temperatura e de osmolaridade, efeitos tóxicos dos crioprotetores e formação de cristais de gelo no ambiente extracelular (WATSON, 2000). Isto se deve provavelmente, devido ao acúmulo de produtos tóxicos oriundos do metabolismo celular ou, principalmente, pelo aumento da produção de espécies de oxigênio reativas (ROS), causando a peroxidação lipídica (WANG et al., 1997; BILADEAU et al., 2001) e a fragmentação de DNA (BAUMBER et al., 2003).

A congelação do sêmen ovino pode ser realizada pelo método convencional (SALAMON e MAXWELL, 1995) ou automatizado (KUMAR et al., 2003), visando preservar a viabilidade das células espermáticas e sua posterior utilização através da inseminação artificial. Segundo Polge (1957), existe uma zona crítica de temperatura entre -15 a -30 °C que determina danos à célula espermática, quando, a seguir, são submetidas à temperatura de -80 °C. No entanto, Drobnis et al. (1993) relatam, em camundongos, que o intervalo de 5 °C a -15 °C é o momento mais crítico para as células espermáticas, uma vez que temperaturas entre 4 e 0 °C são responsáveis pela descontinuidade da permeabilidade da membrana espermática à água.

Para Silva et al. (2007), os antioxidantes funcionam como agentes protetores impedindo a formação das ROS e prevenindo o aparecimento de danos oxidativos nos espermatozóides, com conseqüente preservação de motilidade, vigor, integridade de DNA e das membranas espermáticas, evitando a ocorrência de reação acrossomal precoce. A vitamina C é um potente antioxidante intracelular (MAJD et al., 2003), capaz de combater os efeitos do superóxido e dos radicais hidroxilas (GASSEN e YOUNDIM, 1999). Por outro lado, a vitamina E (e seus derivados hidro e lipossolúveis) atua como substância antioxidante,

protegendo as células de estresse oxidativo (KAGAN et al., 1992; SATOH et al., 1997), destacando-se como potente protetor de membranas biológicas (SIKKA, 2004) e da integridade de DNA (AGARWAL et al., 2004).

A ação sinérgica entre vitamina C e α -tocoferol impede a peroxidação lipídica e protege o DNA dos espermatozoides contra os efeitos deletérios do H_2O_2 (DONNELLY et al., 1999). Em ovinos, a associação de vitamina C e Trolox (análogo do α -tocoferol) determinaram maior porcentual de espermatozoides com motilidade progressiva e reduziram o efeito negativo da diluição (GUERRA et al, 2005). Por isso, objetivou-se com este estudo avaliar a viabilidade *in vitro* do sêmen ovino criopreservado em diluente Tris-gema ou Fiser acrescidos de vitamina C e/ou Trolox utilizando dois métodos de congelção.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram selecionados, após exame andrológico constituído de avaliação clínica geral e do sistema reprodutor, seis reprodutores da raça Santa Inês com idade variando entre 2 a 4 anos, sendo três criados (Experimento I) no município de Gravatá – PE (08° 12' 04'' Latitude Sul, 36° 22' 16'' Longitude Oeste) e três criados (Experimento II) no município de Brejo da Madre de Deus – PE (08° 08' 45'' Latitude Sul, 36° 22' 16'' Longitude Oeste), sendo todos os animais alimentados em pasto formado por capim Tifton e *Brachiaria sp.*, além de serem fornecidos sal mineral e água *ad libitum*.

2.2 Colheita e avaliação do sêmen

Os ejaculados foram colhidos semanalmente (n=24) através do método de vagina artificial, com auxílio de uma fêmea manequim. Imediatamente após a colheita, o sêmen foi mantido em banho-maria (37 °C) e submetido à análise macroscópica (volume, aspecto e pH) e microscópica (turbilhonamento, motilidade e vigor). As amostras de sêmen fresco e descongelado foram avaliadas quanto a motilidade, vigor, integridade de acrossoma, DNA e grau de estresse oxidativo.

2.2.1 Motilidade progressiva e vigor espermático

Uma alíquota de 10 μL de sêmen foi depositada sob lâmina previamente aquecida a 37 °C e conduzida ao microscópio óptico (Optech, Germany), onde se avaliou MP (0-100 %) e vigor espermático (0-5). Em seguida, realizou-se o *pool* de todas as amostras e procedeu-se avaliação de motilidade, vigor e concentração espermática, sendo submetidas à congelação amostras que apresentaram MP $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 (CBRA, 1996).

2.2.2 Integridade do acrossoma

A integridade do acrossoma foi avaliada diluindo 10 μL de sêmen em 990 μL de solução Tris (3,605 g Tris, 2,024 g Ácido Cítrico, 1,488 g Frutose, q.s.p. 100 mL, pH 6,8), a uma concentração final de 1 a 2 milhões de células/mL. A seguir, retirou-se alíquota de 10 μL dessa diluição para confecção das lâminas, as quais foram armazenadas a 4 °C, protegidas da luz e analisadas no prazo de duas semanas. As lâminas foram coradas no momento da análise através da técnica de coloração *FITC*-conjugada ao *Peanut* aglutinina (*FITC*-PNA, ROTH et al., 1998), onde 30 μL de solução de PNA (20 μL PNA + 480 μL Fosfato Salino Tamponado) foi depositada no centro da lâmina e efetuada a homogeneização da amostra, a fim de cobrir grande extensão da lâmina.

Posteriormente, as lâminas sofreram refrigeração a 4 °C durante 20 min e, após este período, foram lavadas em 50mL de PBS (Fosfato Salino Tamponado) e colocadas em caixa de isopor para secagem em temperatura ambiente. Após secagem, alíquotas de 5 μL da solução UCD (5 mg Azida sódica em 0,5 mL Fosfato Salino Tamponado; 5 mg de Fenilenediamina (0,1% w/v); 4,5 mL Glicerol, pH 8,0) foram colocadas entre lâmina e lamínula, e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Germany) utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm), quando foram contados 200 espermatozoides/lâmina e classificados em: a) acrossomas intactos (AI), quando se apresentavam corados em verde; b) acrossomas reagidos (AR), quando apresentavam coloração verde mesclada, sem coloração ou apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática.

2.2.3 Integridade do DNA

Para análise da integridade do DNA espermático através da técnica de Laranja de Acridina (EVENSON et al., 1999), alíquota de 10 μ L de sêmen foi diluída em 990 μ L de solução de TNE (0,15M NaCl; 0,01 M TRIS.HCl; 1mM EDTA.Na₂.2H₂O; q.s.p. 100 mL, pH de 7,4), em tubos de microcentrífuga a uma concentração final de 1 a 2 milhões de células/mL, criopreservadas em nitrogênio líquido e armazenadas -196 °C. No momento da análise, as amostras foram descongeladas a 37 °C, e adicionados 200 μ L de solução de TNE em tubo de microcentrífuga imersos em gelo. Imediatamente após, foram adicionados 400 μ L de solução detergente (0,1 mL Triton X-100; 0,877 g NaCl; 8 mL 1 N HCl), nos respectivos tubos a 5 °C, a fim de induzir a desnaturação do DNA.

Após 30 segundos, adicionou-se 600 μ L da solução de Laranja de Acridina (Polysciences, USA) tamponada (0,1M ácido cítrico; 0,2 M fosfato de sódio; 0,15 M NaCl e 1mM EDTA em pH 6,0). Em seguida, a amostra foi homogeneizada e alíquotas de 5 μ L dessa solução foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Germany), utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm). Um total de 200 espermatozóides/lâmina foi avaliado e classificado como: a) DNA de espermatozóides com estruturas de cromatina anormal apresentavam a fluorescência vermelha e b) DNA de espermatozóides com estruturas de cromatina normal apresentavam fluorescência verde média, no qual reflete o conteúdo de DNA e/ou o grau de condensação da cromatina espermática.

2.2.4 Estresse oxidativo

As amostras foram submetidas ao teste de Nitroblue Tetrazolium (NBT; SALEH e AGARWAL, 2002) para identificação da presença de estresse oxidativo espermático, onde inicialmente foram diluídas (1:1; v:v) em solução de 10% de NBT (Sigma, USA) e incubadas durante 30 min à temperatura de 37 °C. Posteriormente, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente durante 30 min e, em seguida, centrifugadas a 250 x G (durante 5 min). Imediatamente após, o pellet foi diluído em solução Tris (3,605 g Tris, 2,024 g Ácido Cítrico,

1,488 g Frutose, q.s.p. 100 mL, pH 6,8) e efetuado o esfregaço. Após secagem à temperatura ambiente, 200 espermatozoides/lâmina foram contados em microscópio de contraste de fase (100X; Olympus, Germany), sob óleo de imersão, e avaliados quanto ao depósito de formazana na célula: a) Espermatozóide portador de estresse oxidativo, quando identificada presença de formazana na peça intermediária e/ou cabeça espermática, e b) célula espermática sem estresse oxidativo, quando não foi identificada formazana na peça intermediária e/ou cabeça espermática.

2.3 Diluição e congelação do sêmen

Experimento I

Após avaliação do *pool* das amostras, a diluição foi efetuada utilizando Tris-Gema (3,634 g Tris; 0,50 g Glucose; 1,990 Ácido Cítrico; 15 mL Gema de Ovo; 5 mL Glicerol; qsp. 100 mL), acrescido de antioxidantes de acordo com o grupo experimental, seguindo a ordem aleatória de congelação: G1) Tris-Gema; G2) Tris-Gema + 600 µM/L de vitamina C (Sigma, USA); G3) Tris-Gema + 60 µM/L de Trolox (Aldrich, USA) e G4) Tris-Gema + 600 µM/L de vitamina C + 60 µM/L de Trolox. Após diluição, as alíquotas de sêmen (75×10^6 espermatozoides) foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e submetidas à refrigeração durante 90 min na geladeira (5 °C). Após atingir a temperatura de 5 °C, as palhetas foram colocadas em uma caixa de isopor sobre suporte na posição horizontal a 4 cm do nível do nitrogênio líquido, durante 10 min, até atingir à temperatura de -120 °C e, em seguida, foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C).

Experimento II

Para congelação, o *pool* das amostras de sêmen foi submetido ao procedimento de diluição com Fiser [16,28 g TRIS; 7,20 g D-Frutose; 8,51 g Ácido Cítrico; 3,44 g Citrato Trissódico; 0,79 g TES; 1,81 g Glicina; 50,54 g Lactose Monohidratada; 5,93 g Rafinose 5. H₂O; 2,53 g D (+) Frutose; 19,76 g Dextrano B; 120 mL Glicerol; 250 mL Gema de Ovo; qsp. 1.000 mL; pH 7,0], acrescido de antioxidantes de acordo com o grupo experimental,

seguindo a ordem aleatória de congelação: G1) Fiser (Controle); G2) Fiser + 600 µM/L de vitamina C (Sigma, USA); G3) Fiser + 60 µM/L de Trolox (Aldrich, USA) e G4) Fiser + 600 µM/L de vitamina C + 60 µM/L de Trolox. Após diluição, as alíquotas de sêmen (200 X 10⁶ espermatozoides) foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e processadas em máquina de congelação (modelo TK 3000, TK Tecnologia em Congelação Ltda, Brasil), utilizando duas curvas de congelação: Lenta (C1) = -0,25 °C/min de 25 °C a 5 °C, e -20 °C/min de 5 °C a -120 °C; e Rápida (C2) = -0,5 °C/min de 25 °C a 5 °C, e - 12,5 °C/min de 5 °C a -120 °C. Imediatamente após a congelação, as palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C).

2.4 Descongelação e avaliação *in vitro* do sêmen

A descongelação do sêmen foi realizada em banho-maria a 37 °C durante 30 segundos e, a seguir, as amostras foram diluídas em solução Tris (3,605 g Tris, 2,024 g Ácido Cítrico, 1,488 g Frutose, q.s.p. 100 mL, pH 6,8) em 1:1; v:v e avaliadas quanto a MP e vigor espermático. Após avaliação, foi realizado o *pool* de cada grupo, o qual foi avaliado em triplicata após 0 e 60 min de incubação a 37 °C quanto a motilidade progressiva, vigor, integridade de acrossoma e DNA e estresse oxidativo.

2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software estatístico (SISVAR), através da análise de variância (ANOVA) conforme descrito a seguir: Experimento I= entre grupos (G1, G2, G3 e G4) em dois tempos (0 e 60 min) de incubação pós-descongelação e no Experimento II= entre grupos (G1, G2, G3 e G4) e entre curvas (C1 e C2) em dois tempos (0 e 60 min) de incubação a 37 °C, pós-descongelação, e utilizando teste de Tukey para comparação pareada, com delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial (Grupo x Tempo) em nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

Experimento I

As médias dos parâmetros analisados do *pool* de sêmen *in natura* evidenciaram $4,1 \pm 0,35$ de turbilhonamento, $82,5\% \pm 3,77$ de motilidade progressiva, $4,6 \pm 0,50$ de vigor, $68,8 \pm 6,8\%$ de espermatozóides com acrossoma intactos, $100,0\%$ de células com DNA íntegros e $35,5 \pm 5,05\%$ de células com estresse oxidativo.

Os resultados pós-descongelção da avaliação das células espermáticas criopreservadas com Tris-Gema encontram-se na Tabela 1, onde se observa que, imediatamente após a descongelção (momento 0 que correspondeu ao início da incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$), os percentuais de MP, vigor e integridade de acrossoma não evidenciaram diferença estatística significativa entre tratamentos ($p > 0,05$) com vitamina C, Trolox ou vitamina C + Trolox, quando comparados ao grupo controle.

Após o período de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (60 min), a análise de MP, vigor, integridade de acrossoma e estresse oxidativo das amostras congeladas/descongeladas não evidenciaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre tratamentos.

Da mesma forma, a integridade do DNA ($99 \pm 1,0\%$) foi preservada em todas as amostras de sêmen criopreservadas, com ou sem antioxidantes, nos tempos de incubação 0 e 60 min, sem apresentarem diferença estatística ($p > 0,05$) entre tratamentos.

Experimento II

A avaliação das amostras *in natura* de sêmen ovino logo após a formação do *pool* evidenciou $4,0 \pm 0,46$ de turbilhonamento, $80 \pm 4,1\%$ de motilidade progressiva, $4,6 \pm 0,50$ de vigor, $24,0 \pm 9,23\%$ de acrossomas intactos e $65,3 \pm 7,10\%$ de estresse oxidativo.

A análise das amostras diluídas em Fiser, acrescido ou não de antioxidantes (vitamina C e/ou Trolox), logo após a descongelção (0 min) encontram-se na Tabela 2 e na Figura 1, onde se constatou que na curva 1 os parâmetros de MP, vigor, integridade de acrossoma, e estresse oxidativo não evidenciaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos suplementados com vitamina C (G2), Trolox (G3) ou vitamina C + Trolox (G4), quando comparados ao grupo controle (G1). Todavia, a análise de integridade de DNA evidenciou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle (G1) e suplementado com vitamina C (G2) quando comparados ao grupo adicionado de vitamina C + Trolox (G4).

Após o período de incubação de 60 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, observou-se que as amostras congeladas na curva 1 (Tabela 2) apresentaram valores significativamente menores ($p < 0,05$)

nos parâmetros motilidade progressiva, vigor, integridade de acrossoma, e estresse oxidativo quando comparadas àquelas avaliadas imediatamente após a descongelação. Ao se avaliar o efeito da adição de antioxidantes, constatou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle (G1) e aquele suplementado com Trolox (G3) com relação àquele suplementado com vitamina C + Trolox (G4).

Estudando o efeito da curva de congelação (C1 e C2) sobre os resultados obtidos de motilidade progressiva, vigor, integridade de acrossoma e estresse oxidativo, em cada momento isoladamente (0 ou 60 min), constatou-se não haver diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre grupos. Entretanto, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os percentuais de células com DNA íntegros obtidos após 60 minutos de incubação das amostras suplementadas com vitamina C + Trolox (G4), entre as duas curvas de congelação.

4 DISCUSSÃO

As membranas espermáticas dos ovinos são sensíveis às mudanças de temperatura durante os processos de congelação/descongelação devido à elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados, tornando os espermatozóides sensíveis aos danos oxidativos e reduzindo a capacidade de movimentação e de fecundação (AURICH, 2005), visto que os espermatozóides produzem ROS intracelular como resultado da atividade flagelar (GAVELLA e LIPOVAC, 1992), e elevada concentração de ROS desencadeia a peroxidação lipídica (LPO) da membrana espermática interferindo na fluidez, no metabolismo, na integridade do DNA e na motilidade, indicando disfunção de membrana plasmática e/ou alteração mitocondrial causada pela depleção de ATP (AURICH, 2005).

Neste estudo, os resultados sugerem que as células espermáticas já apresentavam desequilíbrio entre a produção de ROS e as concentrações dos antioxidantes antes do processo de congelação, evidenciado através do elevado percentual de células portadoras de estresse oxidativo (Experimento I e II). A difusão de ROS na célula espermática através da membrana mitocondrial e/ou plasmática pode inibir a atividade metabólica e causar severos danos a DNA (ALMEIDA et al., 2006), proteínas, carboidratos e lipídios (MISRA e FRIDOVICH, 1972), o que pode justificar a redução dos percentuais de motilidade encontrados no Experimento II (Tabela 2), quando comparados aos valores das amostras analisadas imediatamente após a colheita, sendo superior à perda espermática preconizada por Ollero et

al. (1996) e Watson (2000), ao afirmarem que 50% dos espermatozóides são danificados durante a congelação.

A refrigeração das amostras de sêmen de 37 a 8°C, especialmente com redução de temperatura superior a 0,3 °C/min, resulta em prejuízos às membranas espermáticas causados pelo choque térmico e caracterizados por perda rápida de motilidade, danos à membrana acrossomal, assim como redução do metabolismo espermático decorrente da perda de enzimas ou de outros componentes intracelulares (AMANN e PICKETT, 1996). Além disso, a refrigeração da célula espermática compromete também a regulação do influxo de cálcio devido às mudanças nos canais protéicos das membranas plasmáticas (WATSON, 2000), dificultando a movimentação aleatória dos lipídios e enrijecendo algumas áreas da membrana plasmática devido à adesão de proteínas a pequenas regiões lipídicas (HAMMERSTEDT et al., 1990), despolarizando a actina F presente no citoesqueleto responsável em promover a exocitose acrossomal (WATSON, 2000), o que pode ter favorecido o grande percentual de espermatozóides com acrossoma reagido nos Experimentos I e II.

Todavia, a curva de congelação não interferiu de modo significativo nos resultados obtidos neste estudo, apesar de terem sido constatados danos irreversíveis aos espermatozóides (Experimentos I e II), possivelmente em função da formação de cristais de gelo, afetando a integridade da membrana acrossomal e nuclear, a motilidade e o metabolismo energético (AMANN e PICKETT, 1996). O efeito da velocidade de refrigeração na sobrevivência de espermatozóides mamíferos congelados em máquina evidenciou que, quando a refrigeração é realizada a -30 °C/min, os danos causados ao acrossoma são menores. Entretanto, a MP é superior quando a refrigeração é realizada a -50 °C/min, quando comparada àquela obtida com as amostras refrigeradas -30 °C/min (KUMAR et al., 2003), discordando dos resultados obtidos no Experimento II (Tabela 2). Por outro lado, os resultados de MP, vigor, integridade de acrossoma e DNA, e estresse oxidativo obtidos na congelação efetuada pelo método convencional (Experimento I) foram superiores aos obtidos com a congelação realizada em máquina, corroborando com os relatos de Kumar et al. (2003).

A descongelação também interfere na integridade espermática, uma vez que ao se utilizar a congelação rápida, a descongelação deverá ser rápida visando dissolver os cristais de gelo antes da recristalização temporária, evitando danos à membrana e outras organelas espermáticas (HAMMERSTEDT et al., 1990). Da mesma forma, os resultados encontrados neste estudo (Experimentos I e II) ratificam os dados de Watson (1995) e Isachenko et al. (2004), ao afirmarem que após a descongelação ocorre redução na velocidade de movimentação espermática em virtude dos processos convencionais de congelação e

descongelamento do sêmen causarem alterações na transição da fase lipídica e/ou aumento na peroxidação (ALVAREZ e STOREY, 1992) e redução na porcentagem de espermatozoides móveis (WATSON, 1995; ISACHENKO et al., 2004). Neste trabalho, tanto na curva 1 (lenta) quanto na curva 2 (rápida) do Experimento II, a descongelamento foi realizada na temperatura de a 37 ° C durante 30 segundos, a fim de eliminar o efeito descongelamento.

Por outro lado, o Trolox é capaz de inibir a LPO através da neutralização de radicais peroxil e alcoxil encontrados nas membranas que resultam em morte celular (PEREIRA et al., 2003). Se o organismo é privado dessa vitamina, as membranas celulares têm sua permeabilidade alterada, permitindo o influxo de cálcio para o citosol, o acúmulo de cálcio nas mitocôndrias e, conseqüentemente, a morte celular (AGARWAL et al., 2004), mas ainda não está comprovado que este antioxidante preserva os percentuais de motilidade ou a capacidade fecundante dos espermatozoides, quando adicionado ao sêmen antes da congelamento (ALMEIDA e BAL, 2005).

Alguns estudos demonstram que o uso de vitamina E em amostras de sêmen ovino pode produzir efeito negativo (UPRETI et al., 1997) ou não interferir na preservação da motilidade espermática (DONNELLY et al., 1999), o que pode explicar os resultados obtidos nesse experimento, uma vez que o Trolox, independente da curva de congelamento, determinou os piores percentuais de vigor espermático. Em contrapartida, a adição deste análogo hidrossolúvel da vitamina E minimizou os danos oxidativos dos espermatozoides criopreservados na curva 2, além de proporcionar menores médias de células com acrossoma reagido, quando comparado aos demais grupos, o que pode ter ocorrido em virtude da movimentação do flagelo necessitar de energia (ATP) e este antioxidante atuar na proteção de membranas biológicas (HOLT, 2000).

Entretanto, os resultados desse estudo mostram que a vitamina C, na concentração utilizada, não foi eficaz em proteger a integridade do acrossoma e do DNA, o que pode ter ocorrido devido ao fato desta vitamina ser altamente sensível às alterações de pH e temperatura (EÇA et al., 2004), ou seja, ter ocorrido aumento da produção das ROS como resposta aos efeitos da congelamento/descongelamento e os minerais existentes no plasma seminal inibirem a ação protetora do ácido ascórbico, uma vez que a mistura *in vitro* entre Cobre-ascorbato ou Ferro-ascorbato induz a formação de radicais livres, os quais danificam DNA, lipídios e proteínas (NORBERG e ÁRNER, 2001).

O DNA espermático, estrutura estável e compacta é pouco afetada pelos processos de congelamento e descongelamento (HAMAMAH et al., 1990). Entretanto, neste trabalho, as amostras de sêmen mostraram-se sensíveis à congelamento rápida (Experimento II),

principalmente no grupo tratado com vitamina C, discordando de Donnelly et al. (1999), ao afirmarem que o ascorbato é capaz de proteger efetivamente a fragmentação de DNA sofrida pelo estresse oxidativo *in vitro*, apresentando poder antioxidante em compartimento aquoso, preferencialmente o ambiente intracelular (HSU e GUO, 2002), que reduz α -tocoferol, peróxidos e superóxidos, além de prevenir a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas (DONNELLY et al., 1999).

Por conseguinte, com base nos resultados das amostras de sêmen ovino avaliadas, conclui-se que o método convencional de congelação de sêmen ovino diluído em Tris-gema suplementado com vitamina C proporciona menor grau de estresse oxidativo às células espermáticas imediatamente após a descongelação.

5 AGRADECIMENTOS

Ao Dr Gustavo Ferrer Carneiro e às Médicas Veterinárias Érica Paes Barreto Xavier de Moraes e Sildivane Valcácia Silva, por ajudarem na aquisição dos animais para execução desse estudo, e ao Professor MSc. Wellyngton Chaves/UNEAL, pela colaboração com as avaliações estatísticas.

6 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; NALLELA, K.P.; ALLAMANENI, S.S. R.; SAID, T. M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an review of the literature. *Reproductive Biomedicine online*, v. 8, p. 616-627, 2004.
- ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinato on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 87, p. 321-337, 2005.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology*, v. 13, p. 232-241, 1992.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 7, p. 185-192, 1996.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane fuction of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 89, p. 65-75, 2005.

- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2003.
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v. 56, p. 275-286, 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).
- DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effect of ascorbate and α -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*, v. 14, n. 5, p. 505-511, 1999.
- DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T. et al. Cold Shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, v. 265, p. 432-437, 1993.
- EÇA, L. P.; FERREIRA, A. T.; BRUNI, A. M.; BERTONCINI, C. R. A. et al. *Biologia Molecular: guia prático e didático*. Rio de Janeiro: Revinter, 2004, 262 p.
- EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*, v. 23, n. 1, p. 25-43, 2002.
- FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K.; HELBOCK, H.J. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 88, p. 11003-11006, 1991.
- GASSEN, M.; YODIM, M. B.H. Free radical scavengers: chemical concepts and clinical relevance. *Journal of Neural Transmission*, v. 56, p. 193-210, 1999.
- GAVELLA, M.; LIPOVAC, V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Archives of Andrology Journal*, v. 28, p. 135-141, 1992.
- GONZALEZ, R.A. F. *Efeito da congelação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2002, 92 p, Tese de Doutorado.

- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. C. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: New York, p. 36-324, 1999, 936 p.
- HAMAMAH, S.; ROYERE, D.; NICOLLE, J.C.; PAQUIGNON, M. et al. Effects of freezing-thawed on the spermatozoa nucleus: a chromatin cytophometric study in the porcine and human species. *Reproduction Nutrition and Development*, v. 30, p. 59-64, 1990.
- HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperms: What we ask them to survive? *Journal of Andrology*, v. 11, p. 73-88, 1990.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p. 3-22, 2000.
- HSU, P-C.; GUO, Y. L. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*, v. 180, p. 33-44, 2002.
- ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; KATKOV, I.I.; RAHIMI, G. et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction*, v. 19, n. 4, p. 932-939, 2004.
- KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, v. 46, p. 246-253, 2003.
- MAJD, E.S.; GOLDGERG, M.; STANISLAWSKI, L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on the biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials*, v. 24, p. 3-9, 2003.
- MEDEIROS, A.S.L. *Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanthões*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Paulista, 2003, 96 p. Dissertação de Mestrado.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. *Journal of Biological Chemical*, v. 247, p. 188-192, 1972.
- NICHI, M. *Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003, 101 p, Dissertação de Mestrado.
- NOILES, E.E.; BAILEY, J.L.; STOREY, B.T. Temperature dependence of the water permeability, L_p , of murine sperm shows a discontinuity between 4° and 0°C. *Cryobiology*, v. 32, p. 220-238, 1995.
- NORBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

- OLLERO, M.; BLANCO, M.; LÓPEZ-PÉREZ, M.J. et al. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B*, v. 680, p. 157-164, 1996.
- PEREIRA, C.; AGOSTINHO, P.; MOREIRA, P.I.; DUARTE, A.I. et al. Estratégia de neuroproteção: Efeito da vimpocetina em modelos *in vitro* de stress oxidativo. *Acta Médica Portuguesa*, v. 16, p. 401-406, 2003.
- POLGE, C. Low temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 147, p. 488-508, 1957.
- PONTBRIAND, D.; HOWARD, J.G.; MAXIMU, M.C. et al. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, v. 26, p. 341-354, 1989.
- ROBERTSON, L.; BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. Effects of cold shock and phospholipase A₂ on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 26, p. 143-149, 1990.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M.; WILT, D.E. et al. Heterologous *in vitro* fertilisation and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 475-482, 1998.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.
- SATOH, K.; KADOFUKU, T.; SAKAGAMI, H. Effect of Trolox, a synthetic analog of α -tocopherol, on cytotoxicity induced by UV irradiation and antioxidants. *Anticancer Research*, v. 17, p. 2459-2464, 1997.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B.A. J. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after first cleavage. *Theriogenology*, v. 67, p. 609-619, 2007.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M. et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, v. 48, p. 269-278, 1997.

VALCARCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; PEREZ, L.; MOSES, D.F. et al. Fluorescent staining as method of assessing membrane damage and postthaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*, v. 41, p. 483-489, 1994.

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

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

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

Tabela 1 - Avaliação *in vitro* de células espermáticas (média e desvio padrão) do sêmen de carneiros Santa Inês submetidos à congelação utilizando antioxidantes vitamina C e Trolox após 0 e 60 min de incubação a 37 °C, pós-descongelação (Experimento I)

Tempo de incubação (min)	Grupos experimentais	MP (M ± DP)	VIGOR (M ± DP)	AI (M ± DP)	SOX (M ± DP)
0	G1	43,0 ± 12,2 ^A	3,4 ± 0,4 ^A	71,0 ± 8,1 ^A	40,8±11,0 ^{aA}
	G2	44,0±7,9 ^A	3,1±0,4 ^A	69,1±9,5 ^A	14,6±9,0 ^{bA}
	G3	56,7±8,3 ^A	3,2±0,2 ^A	67,1±8,4 ^A	22,7±9,6 ^{bA}
	G4	47,1±9,4 ^A	3,1±0,3 ^A	71,8±9,1 ^A	19,6±9,9 ^{bA}
60	G1	33,7±8,9 ^B	2,8±0,3 ^B	58,5±10,0 ^B	46,3±5,0 ^{aB}
	G2	34,6±8,8 ^B	2,7±0,4 ^B	63,5±13,6 ^B	19,2±7,1 ^{bB}
	G3	29,1±7,2 ^B	2,7±0,7 ^B	54,0±11,2 ^B	25,3±8,0 ^{bB}
	G4	38,3±6,9 ^B	2,8±0,3 ^B	55,1±8,8 ^B	22,5±9,4 ^{bB}

M= Média; DP = Desvio padrão, MP = Motilidade progressiva; AI= Acrossoma íntegro; SOX = Estresse oxidativo. G1= Tris Gema; G2 = Tris Gema + 600 µM/L de vitamina C; G3 = Tris Gema + 60 µM/L de Trolox; G4 = Tris Gema + 600 µM/L de vitamina C + 60 µM/L de Trolox; DP= Desvio padrão. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam (p<0,05) entre grupos e tempos de incubação (0 e 60 min) pós-descongelação.

Tabela 2- Motilidade progressiva (%), vigor (0-5), integridade acrossomal (%) e DNA (%) e grau de estresse oxidativo (%) do sêmen de carneiros Santa Inês criopreservado com Fiser acrescido de vitamina C e Trolox em duas curvas de congelação (C1 e C2), após 0 e 60 min de incubação a 37 °C (Experimento II)

Curva de Congelação	Tempo de incubação (min)	Grupos experimentais	MP (M ± DP)	VIGOR (M ± DP)	AI (M ± DP)	DNA (M ± DP)	SOX (M ± DP)
C1	0	G1	13,3±2,9 ^A	3,0±0,1 ^A	60,8±6,8 ^A	98,7±2,3 ^a	82,8±3,8 ^A
		G2	21,7±10,4 ^A	3,0±0,1 ^A	57,7±6,0 ^A	97,1±2,2 ^a	71,0±3,3 ^A
		G3	9,3±6,0 ^A	2,5±0,5 ^A	68,0±7,3 ^A	92,8±3,5 ^{ab}	77,2±4,3 ^A
		G4	16,7±7,6 ^A	2,7±0,6 ^A	52,7±9,0 ^A	88,5±4,1 ^{bc}	73,3±12,0 ^A
	60	G1	11,7±2,9 ^B	3,0±0,1 ^B	34,2±9,8 ^B	95,5±3,3 ^{ab}	83,7±8,7 ^B
		G2	13,3±7,6 ^B	2,5±0,5 ^B	32,2±7,4 ^B	86,7±3,5 ^{bc}	81,0±2,3 ^B
		G3	6,3±7,6 ^B	1,3±0,6 ^B	36,0±12,8 ^B	95,3±8,1 ^{ab}	91,2±4,0 ^B
		G4	6,0±3,6 ^B	2,3±0,6 ^B	27,5±8,3 ^B	81,5±4,3 ^{c†}	90,7±4,0 ^B
C2	0	G1	10,0±5,0 ^A	2,3±0,6 ^A	32,0±6,6 ^A	98,2±3,2 ^a	80,2±6,4 ^A
		G2	16,7±2,9 ^A	2,8±0,3 ^A	43,0±12,0 ^A	93,2±2,8 ^{ab}	80,2±6,4 ^A
		G3	12,3±9,6 ^A	2,0±1,0 ^A	57,3±5,3 ^A	97,3±3,8 ^a	61,2±3,0 ^A
		G4	10,7±8,1 ^A	3,0±0,1 ^A	28,0±4,4 ^A	91,7±2,3 ^{ab}	74,8±3,8 ^A
	60	G1	3,7±2,3 ^B	1,3±0,6 ^B	25,5±9,7 ^B	92,8±3,3 ^{ab}	93,2±4,0 ^B
		G2	9,0±13,9 ^B	1,7±1,2 ^B	30,8±12,5 ^B	95,8±7,2 ^{ab}	91,5±4,8 ^B
		G3	2,3±2,3 ^B	1,0±0,1 ^B	30,0±4,3 ^B	99,9±0,1 ^a	84,2±9,6 ^B
		G4	8,3±7,6 ^B	1,5±1,3 ^B	18,8±5,8 ^B	95,5±7,8 ^{ab*}	88,7±4,6 ^B

MP= Motilidade progressiva; AI = acrossoma íntegro; SOX = estresse oxidativo. C1) -0,25 °C/min de 25 °C a 5 °C, e -20 °C/min de 5°C a -120°C; e C2) -0,5 °C/min de 25 °C a 5 °C, e -12,5 °C/min de 5 °C a -120 °C; G1= Fiser sem antioxidantes; G2 = Fiser + 600 µM/L de vitamina C; G3 = Fiser + 60 µM/L de Trolox; G4 = Fiser + 600 µM/L de vitamina C + 60 µM/L de Trolox; M = média; DP= Desvio padrão. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam p<0,05 entre grupos e tempos (0 e 60 min) de incubação pós-descongelação, respectivamente. Símbolos diferentes na mesma coluna indicam p<0,05 entre curvas de congelação.

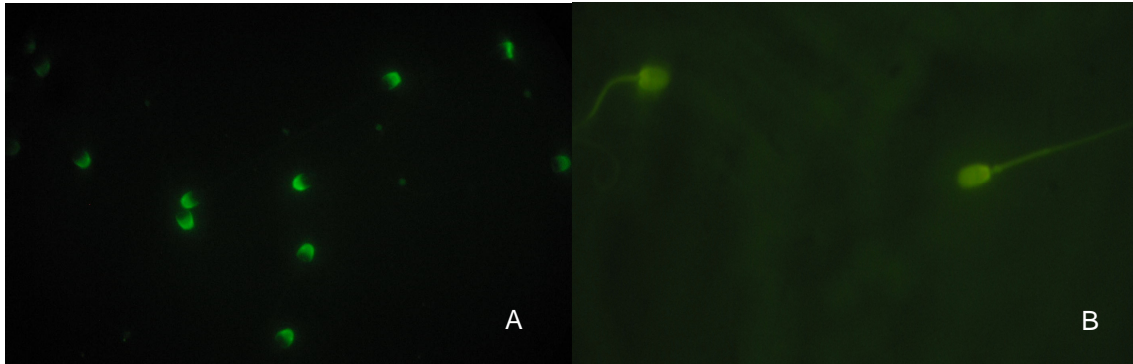


Figura 1 –Espermatozoides ovinos corados com FITC-PNA e Laranja de Acridina, respectivamente, mostrando acrossoma (A) e DNA (B) intactos, após congelação com Fiser acrescido de Trolox.

3.3 Avaliação da cinética, da integridade acrossomal e do estresse oxidativo em espermatozóides ovinos criopreservados em Tris-Gema acrescido de ácido ascórbico e Trolox

Kinetics, acrosome integrity and oxidative stress evaluation on the ram sperm submitted to cryopreservation with ascorbic acid and Trolox

PEIXOTO, A. L. V. de A.¹; MONTEIRO Jr, P. L. J.¹; SILVA, S. V.¹;
NUNES, J. F.²; SALGUEIRO, C. C. de M.²; GUERRA, M. M. P.¹

¹*Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;*

²*Laboratório de Tecnologia do Sêmen – Universidade Estadual do Ceará.*

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar a cinética, a integridade acrossomal e o estresse oxidativo de espermatozóides ovinos criopreservados em Tris-Gema acrescido de ácido ascórbico e Trolox. Sêmen de três reprodutores ovinos da raça Santa Inês (quatro ejaculados/animal) foi colhido com auxílio de vagina artificial e, em seguida, foram efetuadas as avaliações macro (volume, cor, viscosidade e pH) e microscópicas (turbilhonamento, motilidade, vigor), sendo o *pool* de amostras de sêmen submetido a nova análise e ao procedimento de diluição em Tris-gema, de acordo com grupo experimental: G1) Tris-gema (Grupo controle); G2) Tris-gema + 600 µM/L de ácido ascórbico; G3) Tris-gema + 60 µM/L de Trolox e G4) Tris-gema + 600 µM/L de ácido ascórbico + 60 µM/L de Trolox. Palhetas (0,25 mL) contendo 75×10^6 espermatozóides foram refrigerados até 5 °C em geladeira durante 90 minutos, colocadas em vapor de nitrogênio líquido por 10 minutos até atingirem -120 °C e, em seguida, armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C). As amostras foram analisadas imediatamente (Momento 0) e aos 60 minutos incubação a 37 °C, quanto a cinética espermática (MT, MP, VSL, VCL, VAP, LIN, STR, ALH e BCF), além da integridade acrossomal e estresse oxidativo. Os resultados evidenciaram que o período de incubação interferiu negativamente ($p < 0,05$) na integridade acrossomal, no estresse oxidativo e na cinética espermática (MT, MP, VSL, VAP, LIN e STR), independente do grupo. Houve ainda correlação negativa entre integridade acrossomal e estresse oxidativo para o G3 (Trolox) e entre estresse oxidativo e cinética espermática (LIN) no G2 (vitamina C), após 60 minutos de incubação, além de correlação positiva entre integridade acrossomal e cinética espermática (MT) para o G2 (vitamina C).

Com base na avaliação da cinética, da integridade acrossomal e do estresse oxidativo, a adição de ácido ascórbico e Trolox não minimiza os efeitos negativos da criopreservação e da incubação de sêmen ovino à temperatura de 37 °C, pós-congelamento.

PALAVRAS-CHAVES: Cinética, integridade do acrossoma, estresse oxidativo, espermatozóide.

ABSTRACT

This study objectified to evaluate kinetics, acrosome integrity and oxidative stress on the ram sperm submitted to cryopreservation with ascorbic acid and Trolox. Semen of three Santa Ines rams (four ejaculates/animal) was harvested with artificial vagina and evaluated according to macro (volume, color, viscosity and pH) and microscopical parameters (motility and vigor). The *pool* of semen samples was submitted to new analysis and dilution with Tris- egg yolk, in accordance with experimental group: G1) Tris-yolk (Control group); G2) Tris-yolk + 600 µM/L of acid ascorbic; G3) Tris-yolk + 60 µM/L of Trolox and G4) Tris-yolk + 600 µM/L of acid ascorbic + 60 µM/L of Trolox. Straws (0.25 mL) with 75×10^6 spermatozoa were cooled up to 5 °C in refrigerator during 90 minutes, placed in liquid nitrogen vapor per 10 minutes until reaching -120 °C and transferred into the liquid nitrogen storage container (-196 °C). The thawed samples were immediately analyzed (0 min) and after to 60 minutes of incubation at 37 °C according to kinetics (MT, %; MP, %; VSL, µm/s; VCL, µm/s; VAP µm/s; LIN, %; STR, %; ALH, µm and BCF, Hz), beyond acrosome and oxidative stress ($p < 0.05$). The results showed that acrosome integrity, oxidative stress and sperm kinetic (MT, MP, VSL, VAP, LIN and STR), independent of the group, had negative correlation between acrosome integrity and oxidative stress for G3 group (Trolox) and between oxidative stress and LIN on the G2 group (vitamin C) after 60 minutes of incubation, beyond positive correlation between acrosome integrity and total motility to G2 group (vitamin C). Based on the kinetics, acrosome integrity, and oxidative stress, it can be affirmed that the addition of ascorbic acid and Trolox do not minimizes the negative effects of the cryopreservation and the incubation of ram semen at temperature of 37 °C after thawing.

KEYWORDS: Kinetics, acrosome, oxidative stress, spermatozoa.

1 INTRODUÇÃO

Durante a congelação as alterações da estrutura celular acarretada pela formação de cristais de gelo afetam a estrutura físico-química da célula determinam danos à membrana plasmática, ao acrossoma e ao DNA, alterando a motilidade progressiva, o metabolismo para produção de energia (PICKETT et al., 1987; BALL e VO, 2002) e a produção de espécies de oxigênio reativas (ROS; BAUMBER et al., 2003). O desequilíbrio entre as concentrações de ROS e de antioxidantes, conhecido como estresse oxidativo (De LAMIRANDE E GAGNON, 1995), causa redução na qualidade dos parâmetros espermáticos (GUERRA et al., 2004), a qual é acentuada após a descongelação (SILVA et al., 2007). Por isso, estudos mostram o efeito benéfico da adição de vitamina C e/ou Trolox sobre os parâmetros espermáticos (MP, integridade de acrossoma e DNA) do sêmen humano (AGARWAL et al., 2004), bovino (BECONI et al., 1993), eqüino (BALL et al., 2001) e ovino (GUERRA et al., 2005), devido à capacidade que estes antioxidantes têm de proteger as membranas espermáticas da peroxidação lipídica (LPO), reduzindo a ação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e combatendo os danos ao DNA (AGARWAL et al., 2004).

A análise computadorizada do sêmen (CASA) tem sido descrita em bovinos, eqüinos (JANUSKAUSKAS et al., 1999), homem (HIRANO et al., 2001) e ovinos (SOUZA et al., 1999), como método acurado para caracterizar a qualidade do movimento da célula espermática (VERSTEGEN et al., 2002), diferindo da análise convencional realizada de maneira subjetiva (MOSES et al., 1995). Para avaliação da cinética do movimento espermático, realiza-se a reconstrução das trajetórias individuais do espermatozóide, onde são determinadas características de movimentação espermática como velocidade, frequência de batimento flagelar e amplitude da cabeça, as quais possibilitam pressupor a condição fisiológica de cada célula no sistema genital feminino (DAVIS e SIEMERS, 1995; VERSTEGEN et al., 2000).

Estudos mostram correlação positiva entre velocidade de trajetória (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL) e linearidade (LIN) com a fertilidade *in vivo*. Todavia, elevados valores de deslocamento lateral de cabeça (ALH) não são desejáveis em virtude do gasto desnecessário de elevadas concentrações de ATP para a realização deste movimento, o que interfere na sua trajetória no momento do transporte no organismo da fêmea (ARRUDA, 2000). Segundo Pérez et al. (1997), as subpopulações de espermatozoides formados durante a espermatogênese são capazes de interferir na qualidade das células

espermática e podem refletir no batimento de cauda (BCF), na velocidade de trajetória (VAP), na velocidade progressiva (VSL) e na linearidade (LIN).

Apesar da avaliação da cinética espermática ser eficiente método para avaliação morfológica, outras análises devem ser realizadas visando estimar *in vitro* a fertilidade *in vivo* da amostra de sêmen, como por exemplo, integridade de membrana espermática (GRAHAM e MOCÉ, 2005), do DNA (ZINI et al., 2000; MOUSTAFA et al., 2004), do acrossoma (HOLT, 2000; WATSON, 2000) e do estresse oxidativo nas células espermáticas (SIKKA, 2004). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a cinética, a integridade acrossomal e o estresse oxidativo de espermatozóides ovinos criopreservados em Tris-Gema acrescido de ácido ascórbico e Trolox.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados três reprodutores da raça Santa Inês, com idade variando de 2 a 4 anos, criados no município Gravatá – PE (08° 12' 04'' Latitude Sul e, 36° 22' 16'' Longitude Oeste) e alimentados com capim Tifton e *Brachiaria sp.*, além do fornecimento de sal mineral e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a exame clínico-andrológico, sendo selecionados apenas os animais considerados aptos à reprodução.

2.2 Colheita e avaliação do sêmen

Os ejaculados foram colhidos semanalmente (n=12) através do método de vagina artificial, com auxílio de uma fêmea manequim. Imediatamente após a colheita, o sêmen foi mantido em banho-maria (37 °C) e submetido à análise macroscópica (volume, aspecto, pH) e microscópica (turbilhonamento, motilidade, vigor). As amostras de sêmen fresco e descongelado foram avaliadas quanto a motilidade, vigor, integridade de acrossoma, DNA e grau de estresse oxidativo.

2.2.1 Motilidade progressiva e vigor espermático

Uma alíquota de 10 μ L de sêmen foi depositada sob lâmina previamente aquecida a 37 °C e conduzida ao microscópio óptico (Optech, Germany), onde se avaliou MP (0-100 %) e vigor espermático (0-5). Em seguida, realizou-se o *pool* de todas as amostras e procedeu-se avaliação de motilidade, vigor e concentração espermática, sendo submetidas à congelação amostras que apresentaram MP \geq 70% e vigor \geq 3 (CBRA, 1996).

2.2.2 Integridade do acrossoma

A integridade de acrossoma foi avaliada diluindo 10 μ L de sêmen em 990 μ L de solução Tris (3,605 g Tris, 2,024 g Ácido Cítrico, 1,488 g Frutose, q.s.p. 100 mL, pH 6,8), a uma concentração final de 1 a 2 milhões de células/mL. A seguir, retirou-se alíquota de 10 μ L dessa diluição para confecção de lâminas, os quais foram armazenadas a 4 °C, protegidas da luz e analisadas no prazo de duas semanas. As lâminas foram coradas no momento da análise através da técnica de coloração FITC-conjugada ao *Peanut* aglutinina (FITC-PNA, ROTH et al., 1998), onde 30 μ L de solução de PNA (20 μ L PNA + 480 μ L Fosfato Salino Tamponado) foi depositada no centro da lâmina e efetuada a homogeneização da amostra, a fim de cobrir grande extensão da lâmina.

Posteriormente, as lâminas foram refrigeradas a 4 °C durante 20 min e, após este período, foram lavadas em 50mL PBS (Fosfato Salino Tamponado) e colocadas em caixa de isopor para secagem em temperatura ambiente. Após secagem, alíquotas de 5 μ L da solução UCD [5 mg Azida sódica em 0,5 mL Fosfato Salino Tamponado; 5 mg de Fenilenediamina (0,1% w/v); 4,5 mL Glicerol, pH 8,0] foram colocadas entre lâmina e lamínula, e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Germany) utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm), quando foram contados 200 espermatozóides/lâmina e classificados em: a) acrossomas intactos (AI), quando se apresentavam corados em verde; b) acrossomas reagidos (AR), quando apresentavam coloração verde mesclada, sem coloração ou apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática.

2.2.3 Estresse oxidativo

As amostras foram submetidas ao teste de Nitroblue Tetrazolium (NBT; SALEH e AGARWAL, 2002), para identificação da presença de estresse oxidativo espermático, onde inicialmente foram diluídas (1:1; v:v) em solução de 10% de NBT (Sigma, USA) e incubadas durante 30 min à temperatura de 37 °C. Posteriormente, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente durante 30 min e, em seguida, centrifugadas a 250g (durante 5 min). Imediatamente após, o pellet foi diluído em solução Tris (3,605 g Tris, 2,024 g Ácido Cítrico, 1,488 g Frutose, q.s.p. 100 mL, pH 6,8) e efetuado o esfregaço. Após secagem à temperatura ambiente, 200 espermatozoides/lâmina foram contados em microscópio de contraste de fase (100X; Olympus, Germany), sob óleo de imersão, e avaliados quanto ao depósito de formazana na célula: a) Espermatozoide portador de estresse oxidativo, quando identificada presença de formazana na peça intermediária e/ou cabeça espermática, e b) célula espermática sem estresse oxidativo, quando não foi identificada formazana na peça intermediária e/ou cabeça espermática.

2.3 Diluição e criopreservação do sêmen

Após avaliação do *pool* das amostras, a diluição foi realizada com Tris-Gema (3,634 g Tris; 0,50 g Glucose; 1,990 Ácido Cítrico; 15 mL Gema de Ovo; 5 mL Glicerol; qsp. 100 mL) acrescido de substâncias antioxidantes, de acordo com o grupo experimental, seguindo a ordem aleatória de criopreservação: G1) Tris-Gema (Controle); G2) Tris-Gema + 600 µM/L de ácido ascórbico (Sigma, USA); G3) Tris-Gema + 60 µM/L de Trolox (Aldrich, USA) e G4) Tris-Gema + 600 µM/L de ácido ascórbico + 60 µM/L de Trolox. Após diluição, as alíquotas de sêmen (75×10^6 espermatozoides) foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e submetidas a congelação convencional, sendo a refrigeração efetuada durante 90 minutos na geladeira (5 °C). Imediatamente após atingir a temperatura de 5 °C, as palhetas foram colocadas em caixa de isopor, sobre suporte na posição horizontal a 4 cm do nível do nitrogênio líquido durante 10 minutos e, em seguida, imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C).

2.4 Descongelamento e avaliação do sêmen

A descongelamento do sêmen foi efetuada em banho-maria a 37 °C, durante 30 segundos, e posteriormente as amostras foram submetidas à avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA), da integridade de acrossoma e estresse oxidativo, em duplicata após 0 e 60 minutos de incubação a 37 °C.

2.4.1 Avaliação computadorizada do movimento espermático (CASA)

Alíquota de 5 µL da amostra de sêmen foi depositada na câmara de Mackler mantida a 37 °C e examinada pelo microscópio de contraste de fase (100 x) acoplado ao CASA (IVOS – Ultimate; *Hamilton Thorne Biosciences*, USA) que captura e digitaliza as imagens da amostra no computador acoplado (*Nikon*, Japão), conforme descrito por Januskauskas et al. (1999). Foram analisadas, em média, 1.000 células em 8 campos, onde se observou os parâmetros de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), linearidade (LIN, %), progressividade (STR, %), amplitude de deslocamento da cabeça (ALH, µm) e frequência do batimento de flagelo (BCF, Hz).

Foram capturadas 32 imagens, com 25 frame acquire, 56 de contraste mínimo, 3µ de tamanho mínimo celular, >75 µm/s de VAP, > 50 µm/s de VCL, > 50 % para STR e < 50% LIN, conforme configuração do CASA.

2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software estatístico SISVAR, através da análise de variância (ANOVA), a fim de avaliar o efeito da adição de ácido ascórbico e Trolox entre os grupos (G1, G2, G3 e G4), em dois tempos (0 e 60 minutos) de incubação pós-descongelamento, utilizando o teste de Tukey para comparação pareada, com delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial (Grupo x Tempo) em nível de significância de 5% sobre a viabilidade pós-descongelamento (MT, MP, VSL, VAP, LIN, STR, integridade de membrana acrossomal e estresse oxidativo) do sêmen ovino criopreservado.

As médias obtidas entre os grupos (G1, G2, G3 e G4), imediatamente após a descongelamento (0 min) e pós-descongelamento (60 min de incubação a 37 °C) para MT, MP, VSL, VAP, LIN, STR, integridade de membrana acrossomal e estresse oxidativo foram correlacionadas.

3 RESULTADOS

O pool das amostras in natura de sêmen apresentou médias de $82,5 \pm 3,77\%$; $4,1 \pm 0,35$; $4,6 \pm 0,50$; $68,8 \pm 6,8\%$; $100,0\%$ e $35,5 \pm 5,05\%$ para MP, turbilhonamento, vigor, integridade de acrossoma, integridade de DNA e estresse oxidativo, respectivamente.

Com base na Tabela 1, imediatamente após a descongelamento (0 min), as células espermáticas não evidenciaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre grupos em todos os parâmetros da cinética (MT, MP, VSL, VCL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF), assim como da integridade de acrossoma e do estresse oxidativo.

Da mesma forma, após 60 minutos de incubação a 37 °C, as médias dos parâmetros avaliados também não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre grupos para cinética (MT, MP, VSL, VCL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF), integridade acrossomal e estresse oxidativo.

Todavia, comparando o efeito do tempo de incubação (0 e 60 minutos) a 37 °C entre os grupos (G1, Controle; G2, ácido ascórbico; G3, Trolox; G4, ácido ascórbico + Trolox), constatou-se diferença estatística ($p < 0,05$) para os parâmetros MP, MT, VSL, VAP, LIN, STR, AI e SOX (Tabela 1).

Ao analisar os resultados apresentados na Tabela 2, observou-se alta correlação entre AI x SOX apresentando $r = 0,7$ (G1, Controle) e $r = -0,7$ (G3, Trolox); entre AI x VSL constatando-se $r = 0,7$ (G1, Controle) e $r = 0,6$ (G2, ácido ascórbico) e AI x VAP $r = 0,7$ (G4, ácido ascórbico e Trolox). Todavia, a correlação entre estresse oxidativo (SOX) e cinética espermática evidenciou baixo índice de correlação independente do grupo avaliado.

Após 60 min de incubação a 37 °C constatou-se alta correlação negativa entre AI x SOX ($r = -0,6$) para o G3 (Trolox), alta correlação positiva entre AI x MT ($r = 0,7$) para o G2 (ácido ascórbico) e alta correlação negativa entre AI x VCL ($r = -0,9$) e AI x MP ($r = -0,6$) para o G3 (Trolox). Em contrapartida, os índices de correlação entre SOX e cinética espermática foram de $r = -0,6$ (SOX x VSL), $r = -0,6$ (SOX x STR); $r = -0,8$ (SOX x LIN) para G2

(vitamina C); $r= 0,6$ (SOX x VAP) para G3 (Trolox); $r= 0,7$ (SOX x LIN), $r= 0,6$ (SOX x VSL), $r= -0,6$ (SOX x VCL; SOX x BCF) para o G4 (Tabela 3).

4 DISCUSSÃO

A avaliação da cinética espermática não deve ser o único parâmetro para avaliação, por fornecer apenas informações da movimentação flagelar, como reflexo da função axonemal (DAVIS e SIEMERS, 1995), pois segundo Pérez et al. (1997), as subpopulações de espermatozoides formados durante a espermatogênese são capazes de interferir na qualidade das células espermática e podem ser refletidos no batimento de cauda (BCF), na velocidade de trajetória (VAP), na velocidade progressiva (VSL) e na linearidade (LIN).

As células espermáticas apresentavam elevados percentuais de estresse oxidativo no sêmen fresco, imediatamente pós-descongelamento (0 min) e após 60 min de incubação a 37 ° C (Tabelas 1, 2 e 3), exceto para ALH, BFC e VCL ($p>0,05$), o que pode ter sido agravado pelos danos decorrentes da formação de cristais de gelo (MULDREW e Mc GANN, 1994) e da ação tóxica do glicerol (WATSON, 1995), os quais culminam com aumento da permeabilidade da membrana espermática (HINKOSVAKA-GALCHEVA et al., 1989), aparecimento de crioinjúrias no axonema (HOLT, 2000), redução da motilidade e da integridade morfológica (WATSON, 1995; HOLT, 2000; WATSON, 2000) e, conseqüentemente, a fertilidade (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Os baixos percentuais de MT e MP (Tabela 1), não corroboram com Guerra et al. (2005), ao relatarem que amostras de sêmen ovino submetidas à diluição com Tris-Gema e coloração com Hoeschst 33342, acrescido de vitamina C (2.400 μ M) e Trolox (600 μ M) determinaram maior percentual de gametas com motilidade progressiva (24,3 \pm 8,8 % e 22,3 \pm 4,63 % na suplementação com vitamina C e Trolox, respectivamente), reduzindo o efeito negativo da taxa de diluição, da coloração com Hoechst 33342 e da criopreservação. Diferindo do observado por Sönmez e Demirci (2004), ao afirmarem que o ácido ascórbico (0,5; 1 e 2 mg/mL) promove efeito negativo na congelabilidade de sêmen ovino diluído com Tris-gema contendo diferentes proporções de glicerol (3, 5 e 7%) sobre a motilidade, a integridade acrossomal e as patologias espermáticas.

Apesar do controle da concentração das ROS ocorrer pela inclusão de antioxidantes ou pelo uso de condições que reduzam a oxidação durante a congelamento (AGARWAL et al.,

2004), a eficácia do antioxidante depende do tipo e da concentração das ROS/RNS produzidas (PEÑA et al., 2003). Assim, neste experimento é possível que tenha ocorrido ação pró-oxidante ou associação entre os antioxidantes e o diluidor, fazendo com que a vitamina C e/ou Trolox atuem como protetor em determinado sistema, mas falhe na proteção ou mesmo aumente as lesões induzidas em outros sistemas conforme relata Watson (2000).

Os percentuais de integridade acrossomal (Tabela 1), nos diferentes grupos foi sensível apenas ao tempo de incubação, pois há diferença na resistência entre os compartimentos espermáticos pela distribuição heterogênea entre proteínas e lipídios aos danos causados pela criopreservação e pelos danos oxidativos (PARKS e GRAHAM, 1992; MAIA, 2006). Os percentuais de acrossomas intactos obtidos neste experimento não evidenciaram diferença entre os grupos tratados (G2, ácido ascórbico; G3, Trolox; G4, ácido ascórbico e Trolox) e o controle (G1), contrariando Aurich et al. (1997) ao observarem que o ácido ascórbico adicionado ao diluente de refrigeração constituído por Leite desnatado-Glicina resultou no aumento do percentual de espermatozóides com membranas íntegras.

O G3 (Trolox) apresentou-se alta correlação negativa entre AI x SOX ($r=-0,7$), sugerindo maior capacidade fertilizante, o que provavelmente ocorreu devido a sua capacidade antioxidante, impedindo ou minimizando os danos provocados pelas ROS através da redução da propagação de reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas, neutralizando radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (BUETTNER, 1993). A correlação positiva entre velocidade de trajetória (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL) e linearidade (LIN) podem significar elevadas taxas de fertilidade *in vivo* (ARRUDA, 2000). Dessa forma, os espermatozóides com elevada correlação negativa entre estresse oxidativo e integridade acrossomal, correlação positiva entre AI x VAP, VSL, VCL e LIN, correlação negativa entre SOX e VAP, VSL, VCL e LIN podem também significar elevada capacidade fertilizante.

Contudo, pode-se afirmar que, com base na avaliação da cinética, da integridade acrossomal e do estresse oxidativo, a adição de ácido ascórbico e Trolox não minimiza os efeitos negativos da criopreservação e da incubação de sêmen ovino à temperatura de 37 °C, pós-congelamento.

5. AGRADECIMENTOS

Ao Dr Gustavo Ferrer Carneiro e à Médica Veterinária Sildivane Valcácia Silva, por ajudarem na aquisição dos animais para execução desse estudo, e ao Prof. MSc Wellyngton Chaves/UNEAL, pela colaboração com as avaliações estatísticas.

6. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; NALLELA, K.P.; ALLAMANENI, S.S R.; SAID, T.M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 8, p. 616-627, 2004.

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

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane fuction of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 89, p. 65-75, 2005.

AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, v. 48, p. 185-192, 1997.

BALL, B. A.; MEDINA, L.A.V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER; I. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, v. 56, p. 577-569, 2001.

BALL, B.B.; VO, A.T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY 581/591. *Journal of Andrology*, v. 23, p. 259-269, 2002.

BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 60, p. 1239-1247, 2003.

BECONI, M.T.; FRANCA, C.R.; MOR, N.G.; AFFRANCCHINO, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, v. 40, p. 841-851, 1993.

- DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Operational standards for CASA instruments. *Journal of Andrology*, v. 14, p. 385-394, 1993.
- DAVIS, R.O.; SIEMERS, R.J. Derivation and reliability of kinematic measures of motion. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 857-869, 1995.
- De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Andrology*, v. 13, p. 368-386, 1995.
- EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.J. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.
- FOOTE, R.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, v. 71, p. 13-23, 2002.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed sêmen. *Theriogenology*, v. 64, p. 492-504, 2005.
- GUERRA, M.M. P.; De GRAAF, S.; UNDERWOOD, S.; MAXWELL, W.M.C. et al. Efeito de vitamina C e E na viabilidade de espermatozóides ovinos submetidos à diluição, coloração com HOECHST 33342 e congelação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 2005, Goiânia. *Proceedings ...* Goiânia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005. CD- ROOM.
- GUERRA, M.M.P; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (Revisão de literatura). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 28, p. 187-195, 2004.
- HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETRKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology*, v. 26, p. 70-75, 1989.
- HIRANO, Y.; SHIBAHARA, H.; OBARA, H.; SUZUKI, T. et al. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates *in vitro*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 18, p. 213-218, 2001.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 3-22, 2000.

- JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; HÄÄRD, M.G.M. et al. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, v. 52, p. 641-658, 1999.
- KASIMANICKAM, R.; PELZER, K. D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W.E. et al. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology*, v. 65, p. 1407-1421, 2006.
- MAIA, M. da S. *Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), Trolox-C e catalase*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 164 p., 2006, Tese de Doutorado.
- MOSES, D.F.; DE LAS HERAS, M.A.; VACCARCEL, A. Use of computerized motility analysis for the evaluation of frozen-thawed ram spermatozoa. *Andrologia*, v. 27, p. p. 25-29, 1995.
- MOUSTAFA, M.H.; SHARMA, R.K.; THORNTON, J.; MASCHA, E. et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*, v. 19, n. 1, p. 129-138, 2004.
- MULDREW, K.; Mc GANN, M. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophysical Journal*, v. 66, p. 532-541, 1994.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, p. 209-222, 1992.
- PÉREZ, L. J.; VALCÁRCEL, A.; De las HERAS, M.A.; MOSES, D. et al. The storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of subpopulation of spermatozoa. *Theriogenology*, v. 47, p. 549-558, 1997.
- PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MACKINNON, A.O. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin*, n. 3, 1987, 125 p.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M.; WILT, D.E.; BUSH, M. Heterologous *in vitro* fertilisation and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). *Biology of Reproduction*, v. 58, p. 475-482, 1998.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 77-111, 2000.

- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A. J. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after first cleavage. *Theriogenology*, v. 67, p. 609-619, 2007.
- SÖNMEZ, M.; DEMIRCI, E. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, v. 28, p. 893-899, 2004.
- SOUZA, D.B.; BICUDO, S.D.; PAPA, F.O. Study of two methods of collect the ram semen (artificial vagina on eletroejaculation) being used conventional and computerized analysis (HTMA-IVOS-10). In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 26, 1999. *Proceedings ...* Lion, 1999.
- VALLÉ, G.P. Membrana plasmática do espermatozóide. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, n. 36, p. 45-63, 2001.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.
- WATSON, P. F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p.481-92, 2000.
- ZINI, A.; FINELLI, A.; PHANG, D.; JARVI, K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology*, v. 56, p. 1081-1084, 2000.

Tabela 1- Média e desvio padrão (M ± DP) das características do movimento espermático avaliadas pelo sistema CASA, integridade do acrossomal e estresse oxidativo do sêmen ovino criopreservado em Tris-Gema acrescido de vitamina C e Trolox

	Tempo de Incubação							
	0 minutos				60 minutos			
	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
MT (%)	47,7 ± 28,3 ^A	44,3 ± 28,1 ^A	36,4 ± 27,9 ^A	32,7 ± 21,2 ^A	48,0 ± 26,9 ^B	52,1 ± 25,3 ^B	34,3 ± 12,5 ^B	32,4 ± 19,1 ^B
MP (%)	8,2 ± 3,3 ^A	7,7 ± 3,4 ^A	6,8 ± 3,7 ^A	6,4 ± 2,8 ^A	7,6 ± 3,1 ^B	6,8 ± 2,5 ^B	4,9 ± 1,6 ^B	5,6 ± 1,8 ^B
VSL (µm/s)	32,7 ± 2,0 ^A	31,0 ± 3,0 ^A	33,2 ± 3,0 ^A	32,0 ± 1,9 ^A	28,7 ± 2,5 ^B	29,3 ± 1,5 ^B	29,2 ± 0,5 ^B	29,1 ± 1,1 ^B
VCL (µm/s)	101,4 ± 3,5	99,2 ± 3,8	97,9 ± 2,5	96,8 ± 1,7	100,2 ± 2,2	101,1 ± 4,2	100,4 ± 2,1	99,8 ± 2,7
VAP (µm/s)	55,3 ± 2,3 ^A	53,7 ± 3,8 ^A	54,0 ± 1,7 ^A	53,5 ± 2,6 ^A	51,8 ± 2,9 ^B	52,3 ± 2,7 ^B	51,9 ± 0,9 ^B	50,6 ± 2,3 ^B
LIN (%)	32,3 ± 3,4 ^A	31,2 ± 2,7 ^A	34,0 ± 5,0 ^A	31,1 ± 1,8 ^A	28,6 ± 2,4 ^B	29,0 ± 1,5 ^B	29,1 ± 0,8 ^B	29,2 ± 1,9 ^B
STR (%)	59,2 ± 4,7 ^A	57,6 ± 2,9 ^A	61,6 ± 7,0 ^A	59,8 ± 2,8 ^A	55,4 ± 2,6 ^B	56,0 ± 2,6 ^B	56,3 ± 1,3 ^B	57,6 ± 2,3 ^B
ALH (µm/s)	3,6 ± 0,3	3,5 ± 0,3	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,2	3,7 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,6 ± 0,2	3,6 ± 0,2
BCF (Hz)	5,1 ± 0,8	4,8 ± 1,3	5,4 ± 0,9	5,6 ± 0,6	4,7 ± 0,3	5,3 ± 0,7	4,7 ± 0,7	4,9 ± 0,8
AI (%)	68,5 ± 12,7 ^A	76,6 ± 7,3 ^A	70,4 ± 6,0 ^A	80,3 ± 8,6 ^A	49,4 ± 11,2 ^B	66,5 ± 11,0 ^B	56,1 ± 7,1 ^B	56,0 ± 4,6 ^B
SOX (%)	73,7 ± 3,4 ^A	75,5 ± 3,4 ^A	77,7 ± 9,9 ^A	74,7 ± 9,2 ^A	72,7 ± 7,8 ^B	83,6 ± 7,1 ^B	87,3 ± 4,2 ^B	86,9 ± 7,8 ^B

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VSL = velocidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VAP = velocidade de trajeto; LIN = linearidade; STR = Progressividade; ALH = amplitude de deslocamento da cabeça; BCF = frequência do batimento de flagelo; AI = acrossomas íntegros; SOX = estresse oxidativo. G1 = Tris-Gema; G2 = Tris-Gema + 600 µM/L de ácido ascórbico; G3 = Tris-Gema + 60 µM/L de Trolox; G4 = Tris-Gema + 600 µM/L ácido ascórbico + 60 µM/L de Trolox; Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam p < 0,05 entre tempos (0 e 60 minutos) de incubação pós-descongelamento.

Tabela 2 - Índices de correlação entre as médias obtidas para cinética espermática, integridade de acrossomal e estresse oxidativo em espermatozóides ovinos criopreservados em Tris-Gema acrescido de ácido ascórbico e Trolox imediatamente após a descongelação

	AI	SOX	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	MP	MT	ALH	BCF	
G1	AI	1,0										
	SOX	0,7	1,0									
	VCL	0,0	-0,2	1,0								
	VSL	0,7	0,3	0,0	1,0							
	VAP	0,1	-0,3	-0,4	0,1	1,0						
	LIN	0,6	0,3	-0,5	0,9	0,3	1,0					
	STR	0,6	0,4	0,2	0,8	-0,5	0,6	1,0				
	MP	-0,1	-0,1	0,1	-0,4	0,0	-0,3	-0,3	1,0			
	MT	-0,5	-0,4	-0,1	-0,7	0,6	-0,6	-1,0	0,5	1,0		
	ALH	-0,7	-0,5	-0,3	-0,7	0,3	-0,5	-0,8	0,6	0,8	1,0	
	BCF	0,1	0,1	-0,4	0,0	0,7	0,2	-0,4	-0,3	0,5	0,0	1,0
G2	AI	1,0										
	SOX	-0,2	1,0									
	VCL	0,4	-0,1	1,0								
	VSL	0,6	0,0	0,7	1,0							
	VAP	0,3	-0,1	0,7	0,9	1,0						
	LIN	0,6	0,1	0,4	0,9	0,8	1,0					
	STR	0,9	0,2	0,4	0,7	0,4	0,8	1,0				
	MP	0,0	-0,5	0,0	0,3	0,4	0,3	0,0	1,0			
	MT	-0,1	-0,4	0,4	0,4	0,7	0,3	-0,3	0,5	1,0		
	ALH	0,1	-0,3	0,7	0,3	0,6	0,1	-0,1	-0,1	0,7	1,0	
	BCF	0,4	-0,2	0,4	0,8	0,8	0,4	0,4	0,7	0,4	0,4	1,0
G3	AI	1,0										
	SOX	-0,7	1,0									
	VCL	-0,2	0,1	1,0								
	VSL	0,1	-0,1	-0,9	1,0							
	VAP	-0,1	-0,1	0,3	-0,2	1,0						
	LIN	0,1	-0,1	-0,9	1,0	-0,2	1,0					
	STR	0,1	-0,1	-0,9	1,0	-0,5	1,0	1,0				
	MP	-0,1	0,1	0,5	-0,4	0,7	-0,5	-0,6	1,0			
	MT	-0,1	0,0	0,7	-0,6	0,8	-0,6	-0,8	0,8	1,0		
	ALH	-0,2	-0,1	0,5	-0,3	0,3	-0,3	-0,4	0,3	0,7	1,0	
	BCF	0,2	0,2	-0,6	0,6	-0,1	0,6	0,6	0,2	-0,3	-0,6	1,0
G4	AI	1,0										
	SOX	-0,1	1,0									
	VCL	0,4	0,1	1,0								
	VSL	0,5	-0,4	0,4	1,0							
	VAP	0,7	-0,4	0,8	0,7	1,0						
	LIN	0,4	-0,5	0,1	1,0	0,5	1,0					
	STR	-0,1	-0,2	-0,4	0,6	-0,2	0,8	1,0				
	MP	-0,1	-0,5	-0,2	-0,5	-0,2	-0,5	-0,5	1,0			
	MT	0,3	-0,2	0,5	-0,3	0,4	-0,5	-0,9	0,7	1,0		
	ALH	0,0	0,2	0,6	-0,3	0,3	-0,5	-0,8	0,4	0,8	1,0	
	BCF	0,5	-0,3	-0,1	0,5	0,3	0,6	0,4	-0,4	-0,3	-0,6	1,0

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VSL = velocidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VAP = velocidade de trajeto; LIN= linearidade; STR = Progressividade; ALH = amplitude de deslocamento da cabeça; BCF = frequência do batimento de flagelo; AI = acrossomas íntegros; SOX= estresse oxidativo. G1= Tris-Gema; G2 = Tris-Gema + 600 µM/L de ácido ascórbico; G3 = Tris-Gema + 60 µM/L de Trolox; G4 = Tris-Gema + 600 µM/L de ácido ascórbico + 60 µM/L de Trolox.

Tabela 3- Índices de correlação entre as médias obtidas para cinética espermática, integridade de acrossomal e estresse oxidativo em espermatozoides ovinos criopreservados em Tris-Gema acrescido de ácido ascórbico e Trolox após 60 minutos de incubação a 37 °C pós-descongelção

	AI	SOX	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	MP	MT	ALH	BCF
G1	AI	1,0									
	SOX	0,4	1,0								
	VCL	0,5	0,4	1,0							
	VSL	0,3	0,0	0,7	1,0						
	VAP	0,4	0,2	0,8	1,0	1,0					
	LIN	0,2	-0,1	0,6	1,0	0,9	1,0				
	STR	0,0	-0,2	0,5	0,9	0,8	1,0	1,0			
	MP	0,5	0,1	0,7	0,2	0,4	0,0	0,0	1,0		
	MT	0,5	0,6	0,9	0,8	0,9	0,7	0,6	0,4	1,0	
	ALH	0,3	0,0	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	1,0
	BCF	0,5	0,1	0,4	0,8	0,8	0,9	0,8	0,0	0,6	0,5
G2	AI	1,0									
	SOX	0,0	1,0								
	VCL	0,2	0,1	1,0							
	VSL	0,4	-0,6	0,6	1,0						
	VAP	0,3	-0,1	1,0	0,7	1,0					
	LIN	0,3	-0,8	-0,3	0,6	-0,1	1,0				
	STR	0,2	-0,6	-0,6	0,4	-0,4	0,9	1,0			
	MP	0,7	-0,1	0,7	0,7	0,8	0,1	0,0	1,0		
	MT	0,5	0,1	0,9	0,5	0,9	-0,4	-0,6	0,8	1,0	
	ALH	-0,1	0,0	0,7	0,3	0,7	-0,3	-0,4	0,2	0,4	1,0
	BCF	0,2	0,6	0,0	-0,2	-0,1	-0,3	-0,1	0,1	-0,1	0,3
G3	AI	1,0									
	SOX	-0,6	1,0								
	VCL	-0,9	0,3	1,0							
	VSL	-0,1	0,1	0,3	1,0						
	VAP	-0,5	0,6	0,3	0,4	1,0					
	LIN	0,7	-0,2	-0,7	0,5	0,1	1,0				
	STR	0,3	-0,4	0,0	0,6	-0,5	0,4	1,0			
	MP	-0,6	0,5	0,3	0,0	0,7	-0,3	-0,6	1,0		
	MT	-0,5	0,4	0,2	0,0	0,6	-0,2	-0,5	1,0	1,0	
	ALH	0,2	-0,5	-0,1	-0,1	0,0	0,0	-0,1	-0,1	-0,2	1,0
	BCF	-0,3	0,1	0,5	0,7	0,2	0,1	0,5	-0,3	-0,3	-0,3
G4	AI	1,0									
	SOX	0,1	1,0								
	VCL	0,1	-0,6	1,0							
	VSL	-0,4	0,6	-0,6	1,0						
	VAP	-0,2	0,0	0,0	0,6	1,0					
	LIN	-0,3	0,7	-0,9	0,9	0,4	1,0				
	STR	-0,1	0,5	-0,6	0,2	-0,6	0,4	1,0			
	MP	-0,3	-0,4	0,3	-0,2	0,2	-0,3	-0,5	1,0		
	MT	0,0	-0,3	0,1	0,2	0,8	0,1	-0,8	0,5	1,0	
	ALH	0,6	-0,2	0,7	-0,5	0,1	-0,7	-0,6	0,0	0,2	1,0
	BCF	0,0	-0,6	-0,1	-0,4	-0,2	-0,2	-0,2	0,5	0,3	-0,3

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; VSL = velocidade progressiva; VCL = velocidade curvilínea; VAP = velocidade de trajeto; LIN= linearidade; STR = Progressividade; ALH = amplitude de deslocamento da cabeça; BCF = frequência do batimento de flagelo; AI = acrossomas íntegros; SOX= estresse oxidativo. G1= Tris-Gema; G2 = Tris-Gema + 600 µM/L de ácido ascórbico; G3 = Tris-Gema + 60 µM/L de Trolox; G4 = Tris-Gema + 600 µM/L de ácido ascórbico + 60 µM/L de Trolox.

4 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; NALLELA, K.P.; ALLAMANENI, S.S.R.; SAID, T.M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 8, p. 616-627, 2004.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urologic Clinics of North America*, v. 29, p. 817-827, 2002.
- AGARWAL, R.A.; SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update.*, v. 9, p. 1-15, 2003.
- AITKEN, R.J. The amoroso lecture. The human spermatozoa- a cell in crisis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 115, p. 1-7, 1999.
- AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, v. 122, p. 497-506, 2001.
- ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 87, p. 321-337, 2005.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research*, v. 23, p. 77-90, 1989.
- ARCHARYA, U.R.; RATHORE, R.M.; MISHRA, M. Role of vitamin C on lead acetate induced spermatogenesis in swiss mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 9-14, 2003.
- ASKARI, H.A.; CHECK, J.H.; PEYMER, N.; BOLLENDORF, A. Effect of antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Archives of Andrology*, v. 33, p. 11-15, 1994.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 89, p. 65-75, 2005.
- AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, v. 48, p. 185-192, 1997.
- BALL, B.A.; MEDINA, L.A.V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, I. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, v. 56, p. 577-569, 2001.

- BALL, B.B.; VO, A.T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY 581/591. *Journal of Andrology*, v. 23, p. 259-269, 2002.
- BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 60, p. 1239-1247, 2003.
- BECONI, M.T.; FRANCA, C.R.; MOR, N.G.; AFFRANCCHINO, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, v. 40, p. 841-851, 1993.
- BENCHAIB, M.; BRAUN, V.; LORNAGE, J.; HADJ, S. et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, v. 18, n. 5, p. 1023-1028, 2003.
- BIANCHI, M. de L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v. 56, p. 275-286, 2001.
- BRÈQUE, C.; SURAI, P.; BRILLARD, J. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, v. 66, p. 314-323, 2003.
- BROUWERS, J.F.; SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*, v. 63, p. 468-469, 2005.
- BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 300, p. 535-543, 1993.
- CACHICHI, R.C. *Estudo do transporte passivo facilitado de ácido ascórbico através de membrana líquida hidrofóbica*. Universidade Estadual de Campinas, 101 p., 2002, Dissertação de Mestrado.
- CARVALHO, O.F. de; FERREIRA, J.D. de J.; SILVEIRA, N. de A.; FRENEAU, G.E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2002.
- CHINOY, N.J.; MEHTA, R.P. B.R.R.; SEETHALAKSHMI, L.; SHARMA, J.D. et al. Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. *International Journal of Fertility*, v. 31, p. 232-239, 1986.

- CUMMINS, J.; JEQUIER, A.M.; KAN, R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? *Molecular Reproduction and Development*, v. 37, p. 345-362, 1994.
- De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *Journal of Andrology*, v. 13, p. 368-386, 1995.
- De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H. et al. Reactive oxygens species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, v. 2, p. 48-54, 1997.
- De LEEUW, F.E.; de LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.; COLENBRANDER, B. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v. 3, p. 32-44, 1993.
- Di MEO, S; VENDITTI, P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biological Signals and Receptors*, v. 10, p. 125-140, 2001.
- DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effect of ascorbate and α -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*, v. 14, n. 5, p. 505-511, 1999.
- DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T. et al. Cold Shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, v. 265, p. 432-437, 1993.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiology control of cell function. *Physiological Reviews*, v. 82, p. 47-95, 2002.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. dos; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- ENGLAND, G.C.W.; PLUMMER, J.M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 47, 261-270, 1993.
- ESHRE, Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Human Reproduction*, v. 13, n.1, p. 142-145, 1998.

- EUM, H.-A.; LEE, S-M. Effects of Trolox on the activity and gene expression of cytochrome P450 in hepatic ischemia/reperfusion. *British Journal of Pharmacology*, v. 142, p. 35-42, 2004.
- FERREIRA, R. Linus Pauling: Por que Vitamina C? *Química Nova*, v. 27, n. 2, p. 356-357, 2004.
- FISER, P.S.; AINWORTH, L.; FAIRFULL, R.W. Cryosurvival of ram spermatozoa in hypertonic and isotonic diluents. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 62, p. 425-428, 1982.
- FOOTE, R.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, v. 71, p. 13-23, 2002.
- FORD, W.C.L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*, v. 10, p. 387-399, 2004.
- FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K.; HELBOCK, H. J. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 88, p. 11003-11006, 1991.
- GAO, P.; CRITSER, J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Ilar Journal*, v. 41, p. 187-196, 2000.
- GATÉ, L.; PAUL, J.; BA, G.N.; TEW, K.D. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of oxidants. *Biomedicine Pharmacotherapy*, v. 53, p. 169-180, 1999.
- GEY, K.F. Vitamina E plus C and interacting conutrients required for optimal health. *Biofactors*, v. 7, p. 113-174, 1998.
- GUERRA, M.M. P.; De GRAAF, S.; UNDERWOOD, S.; MAXWELL, W.M.C. et al. Efeito de vitamina C e E na viabilidade de espermatozóides ovinos submetidos à diluição, coloração com HOECHST 33342 e congelação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 2005, Goiânia. *Proceedings ...* Goiânia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005. CD- ROOM.
- GUERRA, M.M.P; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (Revisão de literatura). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 28, p. 187-195, 2004.
- GUILLAND, J.C.; LEQUEU, B. *As vitaminas do nutriente ao medicamento*. São Paulo : Santos, 1995. 375p.
- HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, v. 9, p. 1-32, 1990.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovascular Research*, v. 47, n. 1, p. 410-418, 2000.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperms: What we ask them to survive? *Journal of Andrology*, v. 11, p. 73-88, 1990.

HELLSTROM, W.J.G.; BELL, M.; WANG, R.; SIKKA, S.C. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. *Fertility and Sterility*, v. 61, p. 1117-1122, 1994.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 3-22, 2000.

HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; McKELVEY, V.J.; THOMPSON, W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Human Reproduction*, v. 13, n. 5, p. 1240-1247, 1998.

INFANTE, J.P. A function for the vitamin E metabolite α -tocopherol quinone as an essential enzyme cofactor for the mitochondrial fatty acid desaturases. *Federation of European Biochemical Societies*, v. 446, p. 1-5, 1999.

ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; KATKOV, I.I.; RAHIMI, G. et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction*, v. 19, n. 4, p. 932-939, 2004.

JANSSEN, Y.M.; VAN-HOUTON, B.; BORM, P.J.; MOSSURAN, B.T. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Laboratory Investigation*, v. 69, p. 261-274, 1993.

JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 50, p. 261-268, 1977.

JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R.J. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, v. 31, p. 531-537, 1979.

KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; FORTE, T.; SCITA, G. et al. Recycling of vitamin E in low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, v. 33, p. 385-397, 1992.

KATKOV, I.I., KATKOVA, N., CRITSER, J.K., MAZUR, P. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, v. 37, p. 325-338, 1994.

- KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, v. 46, p. 246-253, 2003.
- LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. In: www.Rbi.fmrp.usp.br, 15 p., 2003
- LUCK, M.R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLLES, R. Ascorbic acid and fertility. *Biology of Reproduction*, v. 52, p. 262-266, 1995.
- MADJ, E.S.; GOLDBERG, M.; STANISLAWSKI, L. In vitro effects of ascorbate and Trolox on biocompatibility of dental restorative materials. *Biomaterials*, v. 24, p. 3-9, 2003.
- MANELA-AZULAY, M.; FILGUEIRA, A.L.; MANDARIM-DE- LACERDA, C.; CUZZI, T. et al. A. vitamina C. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 3, p. 265-274, 2003.
- MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 8, p. 1013-1020, 1996.
- McBRIDE, J.M.; KRAEMER, W.J. Free radicals, exercise and antioxidants. *Journal of Strength and Conditioning Research*, v. 280, p. 621-627, 2001.
- MEDEIROS, A.S.L. *Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozóides de garanhões*. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Paulista, 2003, 96 p. Dissertação de Mestrado.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. *Journal of Biology Chemistry*, v. 247, p. 188-192, 1972.
- MOUSSA, M.; MARINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1695-1706, 2002.
- MOUSTAFA, M.H.; SHARMA, R.K.; THORNTON, J.; MASCHA, E. et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*, v. 19, n. 1, p. 129-138, 2004.
- MULDREW, K.; Mc GANN, M. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophysical Journal*, v. 66, p. 532-541, 1994.
- MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A. *Harper bioquímica*. 7.ed. São Paulo: Atheneu, p.582-596, 1994.

- NOILES, E.E.; BAILEY, J.L.; STOREY, B.T. Temperature dependence of the water permeability, L_p , of murine sperm shows a discontinuity between 4 and 0 °C. *Cryobiology*, v. 32, p. 220-238, 1995.
- OBA, L.; CECCHINI, R. Alterações intracelulares decorrentes do estresse oxidativo em hemácias de carneiro. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15, 2002, Maringá, *Proceedings ...* Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2002.
- OEHNINGER, S.; FRANKEN, D.R.; SAYED, E.; BARROSO, G. et al. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Human Reproduction Update*, v.6, p.160-168, 2000.
- OLLERO, M.; PEREZ-PE, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*, v. 37, p. 1-12, 1998.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, p. 209-222, 1992.
- PAULENZ, H.; SÖRDERQUIST, L.; PÉREZ-PE, R.; BERG, K.A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram sperm. *Theriogenology*, v. 57, p. 823-836, 2002.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTINEZ, H.R. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 85-98, 2003.
- PEREIRA, B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. *Motriz*, v. 2, n. 2, p. 71-79, 1996.
- PERIS, S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: Relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *Journal of Andrology*, v. 25, n. 2, p. 224-233, 2004.
- POLGE, C. Low temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London*, v. 147, p. 488-508, 1957.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKERS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, v. 164, p. 166, 1949.
- PONTBRIAND, D.; HOWARD, J.G.; SCHIEWE, M.C.; STUART, L.D. et al. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrossomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, v. 26, p. 341-354, 1989.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 60, p. 403–407, 1980.

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

ROBERTSON, L.; BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. Effects of cold shock and phospholipase A₂ on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 26, p. 143-149, 1990.

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

ROLF, C.; COOPER, T.G.; YEUNG, C.H.; NIESCHLAG, E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Human Reproduction*, v. 14, n. 4, p. 1028-1033, 1999.

ROWE, P.J.; COMHAIRE, F.H.; HARGREAVE, T.B., MELLOWS, H.J. *WHO Manual for the Standard Investigations and the Diagnosis of the Infertile Couple*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. 1993.

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

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 77-111, 2000.

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

SALEH, R.A.; AGARWAL, A.; NELSON, D.R.; NADA, E.A. et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and Sterility*, v. 78, p. 313-318, 2002.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science Technology International*, v. 8, p. 121-137, 2002.

- SÀNCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C. Epididimal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 9, p. 689-696, 1997.
- SANTOS, I.W.; LIMA, V.F.M.H.; BINSFIELD, L.C.; RIBEIRO, A.P.C. Congelamento do sêmen canino comparando diferentes concentrações de glicerol e diferentes tempos de equilíbrio. *Archives of Veterinary Science*, v. 8, p. 57-62, 2003.
- SARLÓS, P.; MÓLNAR, M.; KOKAI, GÁBOR, G. et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*, v. 50, p. 235-245, 2002
- SATOH, K.; KADOFUKU, T.; SAKAGAMI, H. Effect of Trolox, a synthetic analog of α -tocopherol, on cytotoxicity induced by UV irradiation and antioxidants. *Anticancer Research*, v. 17, p. 2459-2464, 1997.
- SHANNON, P.; CURSON, B. Toxic effect and action of dead sperm on diluted semen. *Journal of Dairy Science*, v. 55, p. 615-620, 1972.
- SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, v. 48, p. 835-850, 1996.
- SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A.R. Antioxidant function of vitamins. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 69, p. 7-20, 1992.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of Andrology*, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.
- SIKKA, S.C.; GREEN, A.G.; CHAUHAN, V.; KALRA, V.K. Proteoliposomes interaction with human erythrocyte membranes-functional implantation of gamma glutamyl transpeptidase. *Biochemistry*, v. 21, p. 2356-2366, 1982.
- SIKKA, S.C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.J. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology*, v. 16, p. 464-481, 1995.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B.A.J. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after first cleavage. *Theriogenology*, v. 67, p. 609-619, 2007.
- SONG, G.; NORKUS, E.P.; LEWIS, V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA fragmentation in infertile men. *Fertility and Sterility*, v. 82, p. 235-236, 2004.
- SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Cryobiology*, v. 350 p. 240-254, 1997.

- SÖNMEZ, M.; DEMIRCI, E. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, v. 28, p. 893-899, 2004.
- SOUZA Jr., T.P.; OLIVEIRA, P.R. de; PEREIRA, B. Exercício físico e estresse oxidativo: efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. v. 11, n. 1, p. 91-96, 2005.
- TAYLOR, C.T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 10, p. 189–198, 2001.
- THIELE, J.J.; FREISLEBEN, H.F.; FUCHS, J.; OCHSENDORF, F.R. Ascorbic acid and rate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Human Reproduction*, v. 10, p. 110-115, 1995.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M. et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, v. 48, p. 269-278, 1997.
- URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology*. v. 189, p. 41-54, 2003.
- VALLÉ, G.P. Membrana plasmática do espermatozóide. *Cadernos Técnicos de Medicina Veterinária e Zootecnia*, n.º 36, p. 45-53, 2001.
- VANCINI, R.L.; LIRA, C.A.B. de; ABOULAFIA, J.; NOUAILHETAS, V.L.A. Radical livre, estresse oxidativo e exercício. *Centro de Estudos de Fisiologia do Exercício*, v. 37, p. 1-10, 2005.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analysers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.
- WANG, A.W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I.; ANDERSON, D.J. et al. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, v. 49, p. 921-925, 1997.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P. F. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 77-111, 2000.
- WOOLLEY, D.M.; RICHARDSON, D.W. Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 53, p. 389-394, 1978.

YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effect of ascorbic and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science*, v. 76, p. 99-111, 2003.

YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.A.; LEIBO, S.P. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology*, v. 44, p. 62–78, 2002.

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

ZINI, A.; FINELLI, A.; PHANG, D.; JARVI, K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology*, v. 56, p. 1081-1084, 2000.