

ZORAIDE FERNANDES COLETO

**CONGELAÇÃO DO SÊMEN DA ESPÉCIE CANINA
ADICIONADO DE ANTI-OXIDANTES**

Recife/2006

ZORAIDE FERNANDES COLETO

**CONGELAÇÃO DO SÊMEN DA ESPÉCIE CANINA
ADICIONADO DE ANTI-OXIDANTES**

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

Orientadora:
Prof^a Dra Maria Madalena Pessoa Guerra

Recife /2006

Catálogo na fonte
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central - UFRPE

C694C	<p>Coletto, Zoraide Fernandes Congelação do sêmen da espécie canina adiciona- do de antioxidantes / Zoraide Fernandes Coletto – 2006. 103 f. : il.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Maria Madalena Pessoa Guerra Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Fede- ral Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária Inclui bibliografia</p>
-------	---

CCD 636.708 926

1. Congelação de sêmen
2. Antioxidantes
3. Viabilidade espermática
4. Cão
5. Esperma
- 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**

Congelação do sêmen da espécie canina adicionado de anti-oxidantes

Tese de Doutorado elaborada por

Zoraide Fernandes Coletto

Aprovada pela Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra/UFRPE
Orientadora

Prof. Dr. José Ferreira Nunes/UECE

Profa. Dra. Surama Freitas Zanini/UFES

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho/UFPE

Profa. Dra Ana Lúcia Figueiredo Porto/UFRPE

Prof. Dr. Pierre Castro Soares/UFRPE

Recife/2006

Ao meu pai **Antonio Fernandes**,
quase analfabeto, que tudo fez
para que os filhos dominassem
o saber, **Dedico** *in memoriam*...

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que me sustenta;

A meus pais, pela honra em tê-los como escudo contra o mal;

Ao meu esposo Guido, pelo incentivo, pelo amor e pela paciência;

Aos meus filhos, Guingo, por compreender a ausência; Neno, pelo companheirismo e Gardênia, por ser o meu ombro amigo, o meu freio... e por eles, daria a minha vida;

À minha orientadora, Prof. Dr^a Maria Madalena Pessoa Guerra, a quem respeito muito, com quem sempre conto, e a quem muito amo;

À querida amiga Andréia Fernandes de Souza, por me haver permitido privar de sua amizade e a quem atribuo metade deste sucesso;

À amiga Daniela, seu esposo Ulisses e, agora, Gabriela, por espalharem bondade, neste mundo tão cheio de desamor;

Aos cães Pedro, Bowe, Darth e Smash, pois sem seus ejaculados, nada seria possível;

A Karina de Melo Berinson, ao demonstrar que amigos existem, me ajudando ao abrir as portas do canil High Flair;

As colegas de doutorado Cristiane Scavuzzi Moura, Karen Mascaro Gonçalves da Silva e Guadalupe Xavier de Carvalho pelo desprendimento e valiosa ajuda;

Aos professores Rinaldo Aparecido Mota e Leonildo Bento Galiza da Silva, do Laboratório de Bacterioses, por me ajudarem e pela amizade;

Ao professor Leucio Câmara Alves, do Laboratório de Doenças Parasitárias, pela compreensão e por facilitar meu convívio em seu setor;

Ao meu “filho” José Wilton Pinheiro Júnior, pelo carinho e até pelas brigas, fortalecendo laços de amizade sincera;

Aos colegas Mariana Diel Amorim, Dimas da Costa Marques Filho, Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Júnior, Ellen Cordeiro Bento da Silva, Katarina Michelle Henrique de Almeida Santos, pelo auxílio valioso;

A Sônia Maria Domingos de Lima, Alcir Loureiro de Carvalho e, sobretudo, Joana D’Arc da Rocha Alves que, com senso de responsabilidade, foi imprescindível nas horas críticas;

A Maria Tereza Pereira da Costa, pelos serviços e pela amizade;

A todos que porventura não citei, mas, sou eternamente grata;

A CAPES pelo auxílio financeiro durante a realização do doutorado;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de realizar o doutorado.

RESUMO

Anti-oxidantes funcionam como agentes protetores dos espermatozoides impedindo a formação de espécies de oxigênio reativo (ROS) e conseqüente peroxidação lipídica, aumentando a motilidade e o vigor espermático, e evitando os danos provocados ao DNA. Objetivou-se com este trabalho estudar o efeito da adição de vitamina C e Trolox na congelação de sêmen de cão da raça Cocker Americano. O Pool da segunda fração do sêmen de quatro cães, colhida através de manipulação peniana, foi diluído e suplementado com vitamina C e Trolox na concentração de 200×10^6 espermatozoides/dose, de acordo com cada grupo. Exp. 1: G1= Tris-gema (Controle); G2= Tris-gema + 1200 μ M de vitamina C ; G3= Tris-gema + 2400 μ M de vitamina C; G4= Tris-gema + 100 μ M de Trolox e G5= Tris-gema + 200 μ M de Trolox; Exp. 2: G1= Tris-gema (Controle); G2= Tris-gema + vitamina C (1200 μ M); G3= Tris-gema + vitamina E (200 μ M); G4= Tris-gema + vitamina C (1200 μ M) + E (200 μ M); Exp. 3: G1= Tris-gema ou Kenney (Controle); G2 = Tris-gema ou Kenney + vitamina C (1200 μ M); G3= Tris-gema ou Kenney + Trolox (200 μ M); G4= Tris-gema ou Kenney + vitamina C (1200 μ M) + Trolox (200 μ M). As amostras foram congeladas utilizando duas curvas (C1 = -0,25 °C/min até 5 °C, -15 °C/min até -5 °C, -10 °C/min até -120 °C; C2 = -0,25 °C/min até 5 °C, -20 °C/min até -5 °C, -20 °C/min até -120 °C), sendo C1 nos Exp. 1, 2 e 3, e C2 no Exp. 2, e armazenadas em nitrogênio líquido. Após descongelação a 37 °C durante 30 segundos, observou-se no Exp.1, motilidade espermática significativamente superior ($P < 0,05$) nos grupos controle e tratados com vitamina C (1200 μ M) ou Trolox (200 μ M). O vigor, a integridade do acrossoma e do DNA, bem como o percentual de células espermáticas coradas com Nitroblue tetrazolium não diferiram entre os grupos experimentais. No Exp. 2, a motilidade não diferiu entre grupos ou entre curvas de congelação. Na curva C1, o grupo adicionado de vitamina C + Trolox apresentou mais células com acrossomas intactos, enquanto na C2 não houve diferença entre os grupos. O percentual de acrossomas íntegros da curva 1, não diferiu entre os grupos controle (G1) e com vitamina C (G2), mas foram inferiores ($P < 0,05$) ao de vitamina C + Trolox (G4), enquanto na curva 2, não houve diferença entre os grupos. Ao se comparar curvas de congelação encontrou-se diferença ($P < 0,05$) no percentual de acrossomas reagidos do G2 (vitamina C). Grandes percentuais de espermatozoides apresentaram-se sem estresse oxidativo ou, quando ocorria, concentrava-se na peça intermediária das células. No Exp. 3, a motilidade espermática dos grupos diluídos com Tris-gema e Tris-gema + vitamina C + Trolox foram superiores aos demais grupos. Maior percentual de células com acrossomas íntegros foi observado no grupo suplementado com vitamina C + Trolox. Amostras diluídas em Kenney (sem anti-oxidante) apresentaram maior percentual de acrossomas íntegros do que as diluídas em Tris-gema (sem anti-oxidante). Observou-se maior formação de formazana na cabeça e cauda de células diluídas em Tris-gema + Trolox, do que nas diluídas em Kenney. Conclui-se que a vitamina C (1200 μ M) e Trolox (200 μ M de Trolox) podem ser utilizadas para congelação de sêmen de cão; A adição de vitamina C e Trolox em amostras diluídas em Tris-gema aumenta a viabilidade das células espermáticas congeladas a -15 °C/min e -10 °C/min nas curvas negativas; A suplementação de vitamina C + Trolox minimiza os efeitos deletérios da criopreservação do sêmen sobre a integridade do acrossoma espermático de amostras diluídas em Tris-gema.

Palavras-chave: Diluente, vitamina C, Trolox, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Antioxidants act as protective agents of spermatozoa preventing the reactive oxygen species formation and consequent lipidic peroxidation rising the motility and the vigor and avoiding the damage provoked to the DNA. The aiming of this work was to study the effect of different concentrations of vitamin C and Trolox (water soluble analogue of vitamin E) on the viability of dog sperm cells submitted to the cryopreservation process. The Pool with the second semen fraction of four dogs, harvested through digital manipulation was supplemented with vitamin C and Trolox on the concentration of 200×10^6 sperm cells/dose, according to each group: Exp 1: G1= Tris- egg yolk (Control); G2 = Tris-egg yolk + 1200 μ M of vitamin C; G3= Tris-egg yolk + 2400 μ M of vitamin C; G4= Tris-egg yolk + 100 μ M of Trolox e G5= Tris-egg yolk + 200 μ M of Trolox; Exp 2: G1 = Tris-egg yolk (Control); G2 = Tris-egg yolk + vitamin C (1200 μ M); G3 = Tris-egg yolk + Trolox (200 μ M) and G4 = Tris-egg yolk + vitamin C (1200 μ M) + Trolox (200 μ M); Exp 3: G1 = Tris-egg yolk or Kenney (Control); G2 = Tris-egg yolk or Kenney + vitamin C (1200 μ M); G3= Tris-egg yolk or Kenney + Trolox (200 μ M); G4= Tris-egg yolk or Kenney + vitamin C (1200 μ M) + Trolox (200 μ M). The samples were frozen using two freezing curves (Curve 1 = -0,25 $^{\circ}$ C/min until 5 $^{\circ}$ C, -15 $^{\circ}$ C/min until -5 $^{\circ}$ C, -10 $^{\circ}$ C/min until -120 $^{\circ}$ C; Curve 2 = -0,25 $^{\circ}$ C/min until 5 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C/min until -5 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C/min until -120 $^{\circ}$ C), being C1 on the 1, 2, and 3 Experiments and C2 on the 3 Experiment. The samples were stored in liquid nitrogen. After thawed, it was observed on the Exp.1 that the motility was significantly higher ($P < 0.05$) among Control, vitamin C (1200 μ M) and Trolox (200 μ M) groups. The vigor, motility, acrosomal and DNA integrity, as well as the percentage of sperm cells stained with nitroblue tetrazolium were not different among experimental groups. On the Exp. 2, the spermatic motility after thawing did not differ among the groups or between the two freezing curves. On the C1, the group diluted with vitamin C + Trolox showed more acrosomal integrity, but on the C2 there was no difference among groups. The percentage of intact acrosome from curve 1, did not differ between the control group (G1) and with vitamin C (G2), but were inferior ($P < 0,05$) than the vitamin C + Trolox (G4), meanwhile in the Curve 2, there was no difference among the groups. Comparing the freezing curves, it was found a difference ($P < 0,05$) on the percentage of acrosome prevailed from G2 (vitamin C). Big percentages of sperm cells showed no oxidative stress or, when it occurred, it was concentrated in the middle section of the cells. On the Exp. 3, the sperm motility of the group diluted with Tris- egg yolk supplemented with vitamin C + Trolox were higher than the others. Higher percentage of the cells with intact acrosome were observed on the group supplemented with vitamin C + Trolox. Samples diluted with Kenney (no antioxidant) showed higher percentage of intact acrosome than the diluted on the Tris-egg yolk (no antioxidant). It was observed higher percentage of cells ($P < 0.05$) with head and tail showing the formation of formazana ++ on the samples added with Trolox (G3) and diluted with Tris – egg yolk than those diluted in Kenney. It is concluded that vitamin C (1200 μ M) and Trolox (200 μ M) cab be used to freeze dog semen; The addition of vitamin C and Trolox in Tris – egg yolk diluted samples rise the viability of the spermatic cells frozen at -150 $^{\circ}$ C/min and -10 $^{\circ}$ C/min on the negative curves; the addition of vitamin C associated with Trolox minimize the deleterious effects of the cryopreservation of semen on the sperm acrosomal integrity on the diluted samples in Tris – egg yolk.

Keywords: Diluent, vitamin C, Trolox, oxidative stress.

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
SUMÁRIO	
1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Danos causados pela congelação	9
2.2 Importância de oxidantes na fisiologia espermática	12
2.3 Capacitação espermática	13
2.4 Estresse oxidativo	15
2.5 Diluentes para congelação	18
2.6 Substâncias anti-oxidantes	20
3 EXPERIMENTOS	22
3.1 Efeito de diferentes concentrações de Vitamina C e Trolox na viabilidade de espermatozóides criopreservados de cães	23
3.2 Influência da adição de Vitamina C e Trolox na viabilidade de espermatozóides criopreservados de cães em duas curvas de congelação	45
3.3 Viabilidade de espermatozóides pós-congelação de sêmen canino diluído em Tris-gema ou Kenney, suplementados com anti-oxidantes	64
5 REFERÊNCIAS	85

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

Congelação do sêmen da espécie canina adicionado de anti-oxidantes

Tese de Doutorado elaborada por

Zoraide Fernandes Coletto

Aprovada pela Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra/UFRPE
Orientadora

Prof. Dr. José Ferreira Nunes/UECE

Profa. Dra. Surama Freitas Zanini/UFES

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho/UFPE

Profa. Dra Ana Lúcia Figueiredo Porto/UFRPE

Prof. Dr. Pierre Castro Soares/UFRPE

Recife/2006

Ao meu pai **Antonio Fernandes**,
quase analfabeto, que tudo fez
para que os filhos dominassem
o saber, **Dedico** *in memoriam*...

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que me sustenta;

A meus pais, pela honra em tê-los como escudo contra o mal;

Ao meu esposo Guido, pelo incentivo, pelo amor e pela paciência;

Aos meus filhos, Guingo, por compreender a ausência; Neno, pelo companheirismo e Gardênia, por ser o meu ombro amigo, o meu freio... e por eles, daria a minha vida;

À minha orientadora, Prof. Dr^a Maria Madalena Pessoa Guerra, a quem respeito muito, com quem sempre conto, e a quem muito amo;

À querida amiga Andréia Fernandes de Souza, por me haver permitido privar de sua amizade e a quem atribuo metade deste sucesso;

À amiga Daniela, seu esposo Ulisses e, agora, Gabriela, por espalharem bondade, neste mundo tão cheio de desamor;

Aos cães Pedro, Bowe, Darth e Smash, pois sem seus ejaculados, nada seria possível;

A Karina de Melo Berinson, ao demonstrar que amigos existem, me ajudando ao abrir as portas do canil High Flair;

As colegas de doutorado Cristiane Scavuzzi Moura, Karen Mascaro Gonçalves da Silva e Guadalupe Xavier de Carvalho pelo desprendimento e valiosa ajuda;

Aos professores Rinaldo Aparecido Mota e Leonildo Bento Galiza da Silva, do Laboratório de Bacterioses, por me ajudarem e pela amizade;

Ao professor Leucio Câmara Alves, do Laboratório de Doenças Parasitárias, pela compreensão e por facilitar meu convívio em seu setor;

Ao meu “filho” José Wilton Pinheiro Júnior, pelo carinho e até pelas brigas, fortalecendo laços de amizade sincera;

Aos colegas Mariana Diel Amorim, Dimas da Costa Marques Filho, Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Júnior, Ellen Cordeiro Bento da Silva, Katarina Michelle Henrique de Almeida Santos, pelo auxílio valioso;

A Sônia Maria Domingos de Lima, Alcir Loureiro de Carvalho e, sobretudo, Joana D’Arc da Rocha Alves que, com senso de responsabilidade, foi imprescindível nas horas críticas;

A Maria Tereza Pereira da Costa, pelos serviços e pela amizade;

A todos que porventura não citei, mas, sou eternamente grata;

A CAPES pelo auxílio financeiro durante a realização do doutorado;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de realizar o doutorado.

RESUMO

Anti-oxidantes funcionam como agentes protetores dos espermatozoides impedindo a formação de espécies de oxigênio reativo (ROS) e conseqüente peroxidação lipídica, aumentando a motilidade e o vigor espermático, e evitando os danos provocados ao DNA. Objetivou-se com este trabalho estudar o efeito da adição de vitamina C e Trolox na congelação de sêmen de cão da raça Cocker Americano. O Pool da segunda fração do sêmen de quatro cães, colhida através de manipulação peniana, foi diluído e suplementado com vitamina C e Trolox na concentração de 200×10^6 espermatozoides/dose, de acordo com cada grupo. Exp. 1: G1= Tris-gema (Controle); G2= Tris-gema + 1200 μ M de vitamina C ; G3= Tris-gema + 2400 μ M de vitamina C; G4= Tris-gema + 100 μ M de Trolox e G5= Tris-gema + 200 μ M de Trolox; Exp. 2: G1= Tris-gema (Controle); G2= Tris-gema + vitamina C (1200 μ M); G3= Tris-gema + vitamina E (200 μ M); G4= Tris-gema + vitamina C (1200 μ M) + E (200 μ M); Exp. 3: G1= Tris-gema ou Kenney (Controle); G2 = Tris-gema ou Kenney + vitamina C (1200 μ M); G3= Tris-gema ou Kenney + Trolox (200 μ M); G4= Tris-gema ou Kenney + vitamina C (1200 μ M) + Trolox (200 μ M). As amostras foram congeladas utilizando duas curvas (C1 = -0,25 °C/min até 5 °C, -15 °C/min até -5 °C, -10 °C/min até -120 °C; C2 = -0,25 °C/min até 5 °C, -20 °C/min até -5 °C, -20 °C/min até -120 °C), sendo C1 nos Exp. 1, 2 e 3, e C2 no Exp. 2, e armazenadas em nitrogênio líquido. Após descongelação a 37 °C durante 30 segundos, observou-se no Exp.1, motilidade espermática significativamente superior ($P < 0,05$) nos grupos controle e tratados com vitamina C (1200 μ M) ou Trolox (200 μ M). O vigor, a integridade do acrossoma e do DNA, bem como o percentual de células espermáticas coradas com Nitroblue tetrazolium não diferiram entre os grupos experimentais. No Exp. 2, a motilidade não diferiu entre grupos ou entre curvas de congelação. Na curva C1, o grupo adicionado de vitamina C + Trolox apresentou mais células com acrossomas intactos, enquanto na C2 não houve diferença entre os grupos. O percentual de acrossomas íntegros da curva 1, não diferiu entre os grupos controle (G1) e com vitamina C (G2), mas foram inferiores ($P < 0,05$) ao de vitamina C + Trolox (G4), enquanto na curva 2, não houve diferença entre os grupos. Ao se comparar curvas de congelação encontrou-se diferença ($P < 0,05$) no percentual de acrossomas reagidos do G2 (vitamina C). Grandes percentuais de espermatozoides apresentaram-se sem estresse oxidativo ou, quando ocorria, concentrava-se na peça intermediária das células. No Exp. 3, a motilidade espermática dos grupos diluídos com Tris-gema e Tris-gema + vitamina C + Trolox foram superiores aos demais grupos. Maior percentual de células com acrossomas íntegros foi observado no grupo suplementado com vitamina C + Trolox. Amostras diluídas em Kenney (sem anti-oxidante) apresentaram maior percentual de acrossomas íntegros do que as diluídas em Tris-gema (sem anti-oxidante). Observou-se maior formação de formazana na cabeça e cauda de células diluídas em Tris-gema + Trolox, do que nas diluídas em Kenney. Conclui-se que a vitamina C (1200 μ M) e Trolox (200 μ M de Trolox) podem ser utilizadas para congelação de sêmen de cão; A adição de vitamina C e Trolox em amostras diluídas em Tris-gema aumenta a viabilidade das células espermáticas congeladas a -15 °C/min e -10 °C/min nas curvas negativas; A suplementação de vitamina C + Trolox minimiza os efeitos deletérios da criopreservação do sêmen sobre a integridade do acrossoma espermático de amostras diluídas em Tris-gema.

Palavras-chave: Diluente, vitamina C, Trolox, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Antioxidants act as protective agents of spermatozoa preventing the reactive oxygen species formation and consequent lipidic peroxidation rising the motility and the vigor and avoiding the damage provoked to the DNA. The aiming of this work was to study the effect of different concentrations of vitamin C and Trolox (water soluble analogue of vitamin E) on the viability of dog sperm cells submitted to the cryopreservation process. The Pool with the second semen fraction of four dogs, harvested through digital manipulation was supplemented with vitamin C and Trolox on the concentration of 200×10^6 sperm cells/dose, according to each group: Exp 1: G1= Tris- egg yolk (Control); G2 = Tris-egg yolk + 1200 μ M of vitamin C; G3= Tris-egg yolk + 2400 μ M of vitamin C; G4= Tris-egg yolk + 100 μ M of Trolox e G5= Tris-egg yolk + 200 μ M of Trolox; Exp 2: G1 = Tris-egg yolk (Control); G2 = Tris-egg yolk + vitamin C (1200 μ M); G3 = Tris-egg yolk + Trolox (200 μ M) and G4 = Tris-egg yolk + vitamin C (1200 μ M) + Trolox (200 μ M); Exp 3: G1 = Tris-egg yolk or Kenney (Control); G2 = Tris-egg yolk or Kenney + vitamin C (1200 μ M); G3= Tris-egg yolk or Kenney + Trolox (200 μ M); G4= Tris-egg yolk or Kenney + vitamin C (1200 μ M) + Trolox (200 μ M). The samples were frozen using two freezing curves (Curve 1 = -0,25 $^{\circ}$ C/min until 5 $^{\circ}$ C, -15 $^{\circ}$ C/min until -5 $^{\circ}$ C, -10 $^{\circ}$ C/min until -120 $^{\circ}$ C; Curve 2 = -0,25 $^{\circ}$ C/min until 5 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C/min until -5 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C/min until -120 $^{\circ}$ C), being C1 on the 1, 2, and 3 Experiments and C2 on the 3 Experiment. The samples were stored in liquid nitrogen. After thawed, it was observed on the Exp.1 that the motility was significantly higher ($P < 0.05$) among Control, vitamin C (1200 μ M) and Trolox (200 μ M) groups. The vigor, motility, acrosomal and DNA integrity, as well as the percentage of sperm cells stained with nitroblue tetrazolium were not different among experimental groups. On the Exp. 2, the spermatic motility after thawing did not differ among the groups or between the two freezing curves. On the C1, the group diluted with vitamin C + Trolox showed more acrosomal integrity, but on the C2 there was no difference among groups. The percentage of intact acrosome from curve 1, did not differ between the control group (G1) and with vitamin C (G2), but were inferior ($P < 0,05$) than the vitamin C + Trolox (G4), meanwhile in the Curve 2, there was no difference among the groups. Comparing the freezing curves, it was found a difference ($P < 0,05$) on the percentage of acrosome prevailed from G2 (vitamin C). Big percentages of sperm cells showed no oxidative stress or, when it occurred, it was concentrated in the middle section of the cells. On the Exp. 3, the sperm motility of the group diluted with Tris- egg yolk supplemented with vitamin C + Trolox were higher than the others. Higher percentage of the cells with intact acrosome were observed on the group supplemented with vitamin C + Trolox. Samples diluted with Kenney (no antioxidant) showed higher percentage of intact acrosome than the diluted on the Tris-egg yolk (no antioxidant). It was observed higher percentage of cells ($P < 0.05$) with head and tail showing the formation of formazana ++ on the samples added with Trolox (G3) and diluted with Tris – egg yolk than those diluted in Kenney. It is concluded that vitamin C (1200 μ M) and Trolox (200 μ M) cab be used to freeze dog semen; The addition of vitamin C and Trolox in Tris – egg yolk diluted samples rise the viability of the spermatic cells frozen at -150 $^{\circ}$ C/min and -10 $^{\circ}$ C/min on the negative curves; the addition of vitamin C associated with Trolox minimize the deleterious effects of the cryopreservation of semen on the sperm acrosomal integrity on the diluted samples in Tris – egg yolk.

Keywords: Diluent, vitamin C, Trolox, oxidative stress.

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
SUMÁRIO	
1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Danos causados pela congelação	9
2.2 Importância de oxidantes na fisiologia espermática	12
2.3 Capacitação espermática	13
2.4 Estresse oxidativo	15
2.5 Diluentes para congelação	18
2.6 Substâncias anti-oxidantes	20
3 EXPERIMENTOS	22
3.1 Efeito de diferentes concentrações de Vitamina C e Trolox na viabilidade de espermatozóides criopreservados de cães	23
3.2 Influência da adição de Vitamina C e Trolox na viabilidade de espermatozóides criopreservados de cães em duas curvas de congelação	45
3.3 Viabilidade de espermatozóides pós-congelação de sêmen canino diluído em Tris-gema ou Kenney, suplementados com anti-oxidantes	64
5 REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

A reprodução animal, de maneira geral, beneficia-se da utilização de biotecnologias, objetivando a obtenção de descendentes para a perpetuação de espécies, a obtenção de maiores e melhores quantidades de proteína ou com fins terapêuticos.

A espécie canina está presente na vida do homem desde os tempos mais longínquos, sendo empregada nas atividades de guarda, como animais de companhia, entretenimento ou até mesmo como fonte de alimento em alguns países. Como primeiro relato histórico da aplicação de biotecnologia nesta espécie, tem-se a inseminação artificial realizada por Spallanzani em 1780, objetivando obter prenhez e parição com o sêmen fresco (HAFEZ, 1995).

A introdução de novas tecnologias e o aprimoramento das existentes tem facilitado a vida dos seres vivos influenciando na perpetuação de muitas espécies de animais. Procedimentos visando promover a longevidade dos gametas têm sido utilizados para manter ou simular temperaturas próximas a do corpo, bem como reduzir ou interromper temporariamente o metabolismo através de refrigeração ou congelamento, respectivamente (WATSON, 1995; COLETO et al., 2000a; O'BRIEN et al., 2003).

Os danos sofridos por estruturas celulares tornam-se evidentes quando as condições fisiológicas internas ou externas da célula são modificadas (ALBERTS et al, 1997), sendo necessário o uso de recursos que minimizem estas condições e que protejam as células de injúrias (PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2000). A adição de substâncias diluentes (OLAR et al., 1989; SILVA et al., 1997; SILVA et al., 2000) ou crioprotetoras, a velocidade de centrifugação, o tempo de manipulação, o choque térmico, assim como a saúde geral e reprodutiva do animal interfere na integridade da capacidade fertilizante dos espermatozóides (VISCONTI & KOPF, 1998; SIRIVAIYAPONG et al., 2000; HAMMADEH et al., 2001; ELZANATY et al., 2002).

A escolha do diluidor deve apresentar qualidades relacionadas a pH, osmolaridade, toxicidade e outras características que contribuam com a preservação dos gametas (NUNES & FERNÁNDEZ, 2001). Várias substâncias são utilizadas com o objetivo de proteger as células espermáticas, como o leite desnatado (KENNEY, et al. 1975; MOURA et al., 2002) e a gema de ovo (ENGLAND, 1993; SILVA et al., 2000; MOURA et al., 2002; SILVA et al., 2003).

As substâncias crioprotetoras, como glicerol, são importantes na prevenção do choque térmico, possibilitando a sobrevivência espermática e mantendo a sua capacidade

fertilizante, apesar de reduzir o porcentual de células móveis e viáveis (BAILEY et al., 2000).

A capacidade de locomoção e de fertilização dos espermatozóides é obtida através da ocorrência de fenômenos bioquímicos durante o trânsito destas células pelo epidídimo e/ou sistema genital da fêmea. Estas reações produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), formas reduzidas de oxigênio e seus produtos, que são utilizados nos processos de modulação espermática para a promoção da capacitação e a consequente fertilização de ovócitos ou, quando presentes em quantidades não fisiológicas sob a forma de radicais livres ou eletronicamente desemparelhados, determinam estresse oxidativo (AITKEN et al., 1991; De LAMIRANDE et al., 1997; CHATTERJEE & GAGNON, 2001; SALEH & AGARWAL, 2002; URNER & SAKKAS, 2003; AITKEN et al., 2004; GUERRA et al., 2004). Quimicamente, estas espécies, são altamente reativas e responsáveis pela ocorrência de grande número de afecções, como artrite, arteriosclerose e doenças degenerativas relacionadas com a idade (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

No ejaculado encontram-se substâncias antioxidantes que promovem a proteção natural contra quantidades excessivas de ROS. Recentemente, têm sido utilizados componentes do plasma, visando proteger as membranas e o núcleo celular de danos causados pelos procedimentos biotecnológicos. Tem-se comprovado que dietas suplementadas regularmente com antioxidantes como vitamina C (FRAGA et al., 1991; KAGAN et al., 1992; OMU et al., 1999; ROLF et al., 1999; ESKENAZI et al., 2005), vitamina E ou β -caroteno (DONNELLY et al., 1999; BALL et al., 2001; PEÑA et al., 2003), estão possivelmente relacionadas com o aumento da concentração, da motilidade e da viabilidade espermática (FRAGA et al., 1991; OMU et al., 1999; RIJSSELAERE et al., 2002; YOUSEF et al., 2003; ESKENAZI, et al., 2005).

Antioxidantes presentes no plasma seminal são uma forma importante de proteção aos espermatozóides contra espécies reativas de oxigênio, conhecidas por ROS (SIKKA et al., 1995), os quais determinam estresse oxidativo causando patologias a essas células (JANSSEN et al., 1993).

Os eventos oxidativos que acometem a célula espermática são ainda pouco conhecidos. No entanto, evidências sugerem que os mesmos, são responsáveis por desencadear os mecanismos espermáticos fisiológicos, resultando na união dos gametas (AITKEN et al., 2004; SIKKA, 2004). Dessa forma, considerando a escassez de trabalhos e a variedade de espécies de animais domésticos, muitos estudos ainda são necessários para

elucidar a fonte de produção de ROS, assim como suas conseqüências na fisiologia espermática (GUERRA et al., 2004; GUERRA, 2005).

Geralmente, os testes freqüentemente utilizados em laboratório para análise do sêmen contam com o auxílio da microscopia óptica, através da estimativa da sobrevivência espermática e da porcentagem de espermatozóides com movimentos progressivos (ROWE et al., 1993). Embora úteis, esses testes não são completamente acurados ou repetíveis, em virtude do pequeno número de células avaliadas e da ausência de objetividade, associado à possibilidade de erro humano (GRAHAM et al., 1980). Por conseguinte, segundo Davis & Siemers (1995), maior objetividade e repetibilidade na avaliação do sêmen pode ser obtida através da avaliação de integridade do DNA (ZINI et al., 2000; EVENSON et al., 2002; MOUSTAFA et al., 2004) e do acrossoma (GRAHAM et al., 1990), assim como o grau de estresse oxidativo observado nas células espermáticas (SIKKA, 2001).

Neste estudo, objetivou-se avaliar o efeito qualitativo da adição de vitamina C e Trolox, em diferentes concentrações, no sêmen congelado de cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Danos causados pela congelção

A criopreservação do sêmen, associada à inseminação artificial (IA) oferecem vantagens à indústria da produção animal, principalmente aquelas voltadas a programas de avaliação genética e seleção animal. Entretanto, em muitas espécies, o maior obstáculo à utilização desta biotecnologia está relacionado aos danos causados à membrana espermática durante os procedimentos de refrigeração, congelção e descongelção, reduzindo a viabilidade e a motilidade das células espermáticas e, conseqüentemente, a fertilidade, quando comparada àquela obtida utilizando-se o sêmen fresco (SALAMON & MAXWELL, 1995).

Procedimentos convencionais de criopreservação de sêmen causam danos químicos e físicos as células espermáticas provocando modificações intra e extracelular, as quais são atribuídas alterações de membrana e transição da fase lipídica e/ou aumento na peroxidação lipídica (ALVAREZ & STOREY, 1992), durante a congelção ou após a descongelção, com a conseqüente redução na velocidade e na porcentagem de espermatozóides móveis (WATSON, 1995; ISACHENKO et al., 2004).

Os procedimentos de criopreservação do sêmen de muitas espécies são considerados ineficientes, em decorrência de grande número de células espermáticas tornarem-se aparentemente inférteis após a congelção e descongelção. Comparando-se ao sêmen fresco, uma quantidade oito vezes maior de células espermáticas criopreservadas de bovinos, são necessárias para se obter a mesma taxa de fertilidade (SHANNON & VISHWANATH, 1995). Em ovelhas superovuladas, a taxa de concepção e a porcentagem de óvulos fertilizados com o sêmen congelado após inseminação oviductal ou trans-uterina, é aproximadamente 20% menor quando comparadas àquelas obtidas com sêmen fresco (MAXWELL et al., 1993).

Acredita-se que as conseqüências das crioinjúrias causadas pelo procedimento de criopreservação interferem no transporte e na sobrevivência espermática no sistema genital da fêmea (SALAMON & MAXWELL, 1995). A membrana plasmática do espermatozóide é considerada o local primário de danos observados durante a criopreservação (WATSON, 1995). Alguns estudos têm demonstrado que o efeito osmótico e de variação de temperatura, determinados pelos procedimentos de congelção e descongelção, induzem grandes

alterações no volume de água, resultando em considerável estresse mecânico nas membranas celulares (NOILES et al., 1995).

Durante a refrigeração, as células espermáticas são submetidas a temperaturas de 5 a 4°C e, segundo Noiles et al. (1995), temperaturas entre 4 e 0°C são responsáveis pela descontinuidade da permeabilidade da água na membrana espermática de camudongos. Esses dados sugerem que a fase de transição da membrana ocorre nessa temperatura, estando associada com elevada fluidez e fragilidade, nesta condição.

Espermatozóides de mamíferos domésticos não sobrevivem ao resfriamento rápido até à temperatura de 0°C, determinando choque térmico, que resulta em perda da permeabilidade seletiva da membrana plasmática ao cálcio, promovendo aumento excessivo do nível intracelular e conseqüentemente, redução da motilidade e determinação de necrose celular (ROBERTSON et al., 1990).

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

A fase de refrigeração é considerada de fundamental importância durante o processo de criopreservação, definida como a fase entre a formação de cristais de gelo e a conseqüente desidratação celular, o que determina se as células permanecerão em equilíbrio com o seu ambiente externo ou tornar-se-ão progressivamente congeladas, aumentando a possibilidade de formação de gelo intracelular. Kumar et al. (2003) mostraram que a curva de congelação de -30°C/min é considerada ótima para minimizar os danos causados pelo processo de criopreservação, corroborando com os relatos de Polge (1957), que originalmente reportou existir uma zona crítica de temperatura (entre -15 a -30°C) responsável por danos aos espermatozóides, evidenciando que, se a taxa de congelação não for ótima, todas as células serão danificadas quando submetidas à temperatura de -80°C.

Danos ocorridos durante a criopreservação dependem da estabilidade estrutural da membrana plasmática dos espermatozóides (De LEEUW et al., 1993). Diferenças entre espécies, relacionadas à sensibilidade espermática durante o procedimento de refrigeração são amplamente atribuídas à variação na composição dessa membrana. Baixos níveis de colesterol são encontrados em espermatozóides bovinos e ovinos, os quais são considerados sensíveis à refrigeração, quando comparados àqueles obtidos do homem e do coelho (NOILES et al., 1995). Da mesma forma, a susceptibilidade à baixa temperatura pode ser

explicada pela relação entre as quantidades de ácidos graxos saturados e insaturados presentes na membrana plasmática. De acordo com White (1993), espermatozóides bovinos, ovinos e suínos, considerados sensíveis a criopreservação, possuem maior taxa de ácidos graxos saturados/insaturados (>2.5), quando comparados com as espécies canina e humana (~ 1).

Apesar da preservação da motilidade, espermatozóides humanos criopreservados exibem significantes danos na membrana plasmática, indicados através do teste hiposmótico (CHECK & CHECK, 1991). Alterações na membrana, causadas pela criopreservação, afeta inevitavelmente, os processos de capacitação e hiperativação espermática, bem como o de fertilização, o que pode ser observado pelo fato de que quando igual número de células é inseminado, a fertilidade do sêmen fresco mostra-se superior àquela observada com o sêmen criopreservado (WATSON, 1995).

O desequilíbrio na capacitação e/ou reação do acrossoma comprometem severamente o potencial fertilizante da célula espermática (BAILEY et al., 1994).

Segundo Harrison & Vickers (1990) e Coletto (2000), espermatozóides classificados como danificados apresentaram motilidade e vigor, comparáveis àqueles considerados com membrana íntegra, demonstrando que estes parâmetros comumente utilizados para avaliar a capacidade fertilizante dos espermatozóides, não devem ser as únicas formas de análise das células espermáticas.

Em ejaculados de diversas espécies de animais domésticos, alguns protocolos foram desenvolvidos objetivando verificar a saúde reprodutiva ou a aplicação de tecnologias que permitam o aproveitamento posterior dos espermatozóides, preservando a integridade e o poder fecundante ou reduzindo a ocorrência de danos a estes gametas (AITKEN et al., 1993; GUERRA et al., 1997; COLETO et al., 2001).

As análises macroscópicas e microscópicas são utilizadas visando conhecer e avaliar a morfologia, a fisiologia, os processos patológicos e os danos provocados aos gametas de forma natural e os decorrentes da aplicação de tecnologias. A integridade e/ou os danos das estruturas espermáticas, como o acrossoma ou componentes de membranas são avaliados através da aplicação de técnicas de observação, de coloração ou de contagem de componentes ou substâncias celulares com ou sem fluorescência (MAXWELL et al., 1997; GUERRA et al., 1997; COLETO et al., 2000b; O'BRIEN et al., 2003).

2.2 Importância de agentes oxidantes na fisiologia espermática

O termo espécies reativas de oxigênio (ROS) inclui formas reduzidas de oxigênio e seus produtos de reação com outras moléculas. Alguns são radicais livres, considerados espécies químicas altamente reativas, devido à presença de elétrons desemparelhados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Como todas as células vivas sob condições aeróbicas, os espermatozóides também produzem ROS originados, principalmente, de sua atividade metabólica normal (De LAMIRANDE et al., 1997), tendo sido proposto que esse produto atua na regulação da maturação espermática, uma vez que a glutathione peroxidase (GPx4) pode utilizar os grupos tióis (-SH) de proteínas nucleares como alternativa para reduzir a glutathione. A geração de peróxidos lipídicos pelas ROS deve fornecer substrato para a enzima GPx4 promover a oxidação dessas proteínas e facilitar a condensação nuclear (AITKEN & VERNET, 1998).

A membrana plasmática dos espermatozóides é rica em ácidos graxos poliinsaturados, particularmente C 22:6, tornando-a fluida para os eventos associados com a fertilização, mas, em contrapartida, mais vulnerável a danos peroxidativos (JONES et al., 1979).

O espermatozóide foi considerado gerador ativo de ROS a partir de 1943, quando o andrologista escocês John MacLeod demonstrou que a adição de catalase reverte a perda da motilidade observada normalmente quando essas células são colocadas sob condições aeróbicas (GRIVEAU et al, 1995a).

A idéia de que limitada quantidade de ROS pode intervir de maneira fisiológica na regulação de algumas funções espermáticas foi primeiro demonstrado por Aitken et al. (1989), onde observaram que baixa concentração de ROS pode aumentar a habilidade espermática de se ligar à zona pelúcida.

Recentemente, outros estudos confirmaram que baixa e controlada concentração de ROS, tais como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, possuem papel importante na fisiologia espermática por induzir a hiperativação, a capacitação e a reação do acrossoma *in vitro* (De LAMIRANDE et al., 1997). No entanto, não se sabe qual o sistema enzimático responsável pela produção de O_2^- espermático relacionado a essas atividades celulares. Acredita-se que a presença de uma oxidase encontrada na membrana plasmática do espermatozóide, bem como sua ativação durante a capacitação (De LAMIRANDE & GAGNON, 1995) e reação do acrossoma (AITKEN et al., 1995), esteja relacionada à

proteína quinase C. Todavia, a localização e os requerimentos para a sua ativação ainda devem ser estabelecidos (De LAMIRANDE et al., 1997).

2.3 Capacitação espermática

A capacitação está associada com aumento na fosforilação da proteína tirosina, como consequência de alterações nas células espermáticas induzidas por ROS (AITKEN et al., 1995), assim como, a vários outros eventos bioquímicos (VISCONTI & KOPF, 1998). Embora possa ocorrer espontaneamente sob condições *in vitro*, o processo *in vivo* é regulado pelo sistema reprodutor feminino (HUNTER et al., 1998).

Estudos vêm demonstrando que a capacitação espermática é um processo oxidativo, onde pequenas concentrações de ROS, geradas de maneira endógena, através dos espermatozóides ou exógena, são necessárias para iniciar o fenômeno *in vitro*. O envolvimento de um tipo específico de ROS na célula espermática pode depender das condições de incubação (meio) e da espécie estudada. Por conseguinte, fluidos ou células do sistema reprodutor feminino podem também induzir a produção de ROS pelos espermatozóides. O fato de que a concentração de oxigênio nesses fluidos permanece baixa, exceto no momento da ovulação (MAAS et al., 1976), indica a relevância fisiológica do oxigênio e seus metabólitos nas funções espermáticas (De LAMIRANDE et al., 1997).

Concentrações fisiológicas de ROS têm sido propostas em aumentar a capacitação espermática através do aumento da síntese de cAMP e posterior fosforilação da proteína tirosina pela tirosina quinase (FORD, 2004). Segundo Leclerc et al. (1998), o aumento da atividade de Ca^{2+} intracelular durante a capacitação provoca incremento na concentração de cAMP que estimula a produção de ânion superóxido que, em contrapartida, induz a fosforilação da proteína tirosina. Foi observado que, durante o processo de maturação espermática de ratos, o ânion superóxido estimula indiretamente a tirosina quinase, enquanto H_2O_2 estimula diretamente a tirosina quinase e inibe a tirosina fosfatase (LEWIS & AITKEN, 2001). Experimentalmente, observou-se que em espermatozóides bovinos a adição de $50\mu\text{mol/L}$ de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) aumenta a concentração de cAMP através da estimulação da atividade adenil ciclase e posterior fosforilação da proteína tirosina de maneira similar ao efetuado pelos agentes capacitantes como a heparina (TAN et al., 1995).

O fato de a capacitação espermática ocorrer espontaneamente *in vitro*, sem a adição de fluidos biológicos, sugere que este é um processo intrinsecamente modulado pelo próprio

espermatozóide e, apesar de algumas substâncias (albumina, Ca^{2+} e HCO_3^-) serem utilizadas para capacitar espermatozóides *in vitro*, não se conhece o processo pelo qual elas se ligam às membranas e regulam os eventos intracelulares que iniciam esse processo (VISCONTI & KOPF, 1998). Sabe-se apenas que a albumina do soro, principalmente BSA, remove colesterol da membrana plasmática (CROSS, 1998), resultando no aumento de sua fluidez (WOLF et al., 1986).

Da mesma forma, para a capacitação, existe divergência no tipo de ROS envolvido na reação do acrossoma, o que pode ser explicado pela utilização de diferentes métodos empregados para capacitar espermatozóides e induzir a reação do acrossoma (RA). Entretanto, ressalta-se a importância de que a capacitação e a RA são processos oxidativos que envolvem H_2O_2 , O_2^- ou ambos, através de ROS provavelmente geradas pelos espermatozóides (De LAMIRANDE et al., 1997).

O conceito de que condições oxidantes amenas promovem ou são requeridas para a RA e a ligação dos espermatozóides à zona pelúcida são recentes, onde se evidenciam que a peroxidação lipídica, geralmente associada à redução da viabilidade e da função espermática (GRIVEAU et al., 1995a), também habilitam essas células a ligar-se à zona pelúcida homóloga e heteróloga (AITKEN et al., 1989). Por conseguinte, a fosforilação da proteína tirosina parece ser um pré-requisito necessário para o espermatozóide fertilizar o ovócito (URNER et al., 2001).

Alguns espermatozóides apresentam aumentada fosforilação de proteínas em toda a cauda durante a capacitação. No entanto, a fosforilação observada na peça principal é conhecida por ser um pré-requisito para a fosforilação na peça intermediária, entretanto, nos espermatozóides humanos, essa constatação foi restrita à peça principal (URNER & SAKKAS, 2003). Em espermatozóides de camundongos, Pukazhenthil et al. (1998) observaram que, embora a fosforilação de proteínas que ocorre durante a capacitação não seja requerida para que os espermatozóides se liguem à zona pelúcida, *in vitro*, gametas apresentaram fosforilação da tirosina na peça principal, indicando que a fosforilação é benéfica para essa ligação.

A ausência de glucose durante o processo de capacitação espermática, com conseqüente atraso na fosforilação da tirosina, não afeta a fertilização, desde que este carboidrato seja adicionado no início do procedimento de união dos gametas. Entretanto, a sua ausência durante a interação destes gametas impede a fertilização, indicando que a indução da fosforilação de tirosina ocorre em tempo preciso, uma vez que a ligação do espermatozóide ao ovócito é crítica para o sucesso da fertilização (URNER & SAKKAS, 2003).

As membranas espermáticas são constituídas de fosfolipídios, glicolipídios e esteróis, que exercem papel regulador e bloqueador da capacitação em espermatozoides recém ejaculados (ALBERTS et al, 1997; CROSS, 1998). As proteínas, por sua vez, são responsáveis pela preservação do DNA, além de atuarem nas enzimas do acrossoma, no transporte de íons e carboidratos ou como agente formador do citoesqueleto ou de filamentos da cauda (KIERSZENBAUM, 2004).

O espermatozoide viável deve passar pelo processo de capacitação compreendendo reações e interações complexas, onde as concentrações de cAMP e cálcio intracelular são baixas, em virtude das células ainda se encontrarem imóveis, sem consumo de ATP ou apresentando níveis basais de metabolismo (AITKEN, 1997). Entretanto, no início da capacitação as concentrações destas substâncias aumentam, fazendo com que os espermatozoides adquiram movimentos conhecidos como hiperativação, aumentando a fosforilação da tirosina em ausência de quinase ou fosfatase (MILLER & BRZEZINSKA, 1993; URNER & SAKKAS, 2003).

2.4 Estresse oxidativo

Durante os procedimentos de criopreservação, a irreversível redução na motilidade, na integridade morfológica e na capacidade fertilizante de uma subpopulação de espermatozoides pode ser determinada pelo acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo celular ou, principalmente, pelo aumento na produção de ROS decorrente da redução univalente de oxigênio, como por exemplo, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio (MISRA & FRIDOVICH, 1972; WANG et al., 1997; BAUMBER et al., 2003).

Atualmente, vários estudos têm demonstrado que os espermatozoides são capazes de produzir quantidades controladas de ROS endógeno, com o objetivo de induzir a capacitação espermática e a reação do acrossoma, promovendo a habilidade fertilizante dos espermatozoides (De LAMIRANDE & GAGNON, 1995; RIVLIN et al., 2004). Em contrapartida, altas concentrações de ROS prejudicam a motilidade, viabilidade e função espermática através da interação com lipídios da membrana, proteínas, DNA mitocondrial e nuclear (HELLSTROM et al., 1994, GUERRA, 2005).

A possível explicação para esse processo baseia-se no fato de que as membranas de espermatozoides de mamíferos são ricas em ácidos graxos poliinsaturados que as tornam fluida e, ao mesmo tempo, susceptíveis a danos peroxidativos induzidos pelos radicais livres (SIKKA et al., 1982), determinando perda da função da membrana (AGARWAL &

SALEH, 2002; AGARWAL & SAID, 2003) e da integridade do DNA (AITKEN, 1999; AITKEN & KRAUSZ, 2001; SALEH et al., 2002; MOUSTAFA et al., 2004). Peris et al. (2004) demonstraram que a redução na porcentagem de espermatozóides viáveis ovinos, submetidos a criopreservação, está diretamente relacionada com o aumento da desnaturação da cromatina. Por conseguinte, é possível que danos na estrutura do DNA ocorridos durante o procedimento de criopreservação sejam responsáveis pela baixa taxa de fertilidade do sêmen ovino (SALAMON & MAXWELL, 1995; PERIS et al., 2004) e humano (BENCHAIB et al., 2003), quando comparados ao sêmen fresco.

Em condições normais, os mecanismos anti-oxidativos celulares, presentes em quase todos os tecidos e suas secreções, são responsáveis por inibir a elevada produção de ROS, protegendo as células de danos oxidativos (JONES et al., 1979). No entanto, enzimas antioxidantes intracelulares não conferem proteção total à membrana plasmática que envolve o acrossoma e a cauda, forçando os espermatozóides a suplementarem essa limitada defesa intrínseca com a proteção conferida pelo plasma seminal, o qual contém antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutase, catalase (ZINI et al., 1993) e glutational peroxidase (ALVAREZ & STOREY, 1989), além de uma variedade de antioxidantes não enzimáticos, como ascorbato, urato, α -tocoferol, piruvato, glutational, taurina e hipotaurina (SALEH & AGARWAL, 2002).

Iniciado o processo oxidativo, a funcionalidade das membranas é alterada pelo próprio metabolismo fisiológico, produzindo ROS. O desequilíbrio entre a produção e a utilização destes metabólitos determina reação oxidativa em cadeia, ocasionando a peroxidação lipídica das membranas (MILLER & BRZEZINSKA, 1993; ZINI et al., 1993; ZALATA et al., 1995; De LAMIRANDE et al., 1997; GRIVEAU & LANNOU, 1997).

Tem sido sugerida a utilização do escore obtido entre as concentrações de ROS e TAC (capacidade antioxidante total) como uma melhor forma de prever a condição fertilizante dos espermatozóides, quando comparado à análise desses parâmetros isolados (SHARMA et al., 1999).

As espécies reativas, como peroxil, reagem facilmente com muitos compostos orgânicos (AITKEN et al., 1998; SHNIZER et al., 2003). Elevadas concentrações de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato), Fe^{2+} e ascorbato podem induzir peroxidação em virtude de atuarem nos ácidos graxos insaturados da membrana, produzindo efeito tóxico com conseqüente dano ao DNA nuclear e mitocondrial dos espermatozóides (ALVAREZ & STOREY, 1989; STOREY, 1997; TWIGG et al., 1998; BAUMBER et al., 2003; AITKEN & BAKER, 2004; MOUSTAFA et al., 2004). Quantidades basais, ao

contrário, beneficiam os espermatozóides (ARMSTRONG et al., 1999; RIVLIN et al., 2004).

Muitos procedimentos utilizados em laboratório, geralmente retiram o plasma seminal e/ou adicionam diluentes, antes dos procedimentos de criopreservação, reduzindo a proteção conferida pelos antioxidantes naturais aos espermatozóides (OCHSENDORF, 1999; BILODEAU et al., 2000). Atualmente, evidências têm sugerido que baixa capacidade antioxidante total (TAC) encontrada no sêmen está relacionada à infertilidade masculina (SIKKA, 2001).

O desequilíbrio entre ROS e TAC, presente no fluido seminal indica a ocorrência de estresse oxidativo, responsável por infertilidade no homem (ZINI et al., 1993; SHARMA et al., 1999; WANG et al., 2003), decorrente de patologias espermáticas localizadas na cabeça, acrossoma e peça intermediária, assim como persistência de gota citoplasmática (AZIZ et al., 2004). Aitken & Krausz (2001) constataram que o estresse oxidativo promove alterações no DNA, principalmente fragmentação do cromossomo Y, reduzindo o índice de gestações (AITKEN et al., 1998; GANDINI et al., 2000; MARCHETTI et al., 2002; BENCHAIIB et al., 2003; BAUMBER et al., 2003; KITAGAWA et al., 2004).

A avaliação do estresse oxidativo tem sido executada através do uso do corante Nitroblue tetrazolium (NBT), em virtude do sistema oxidase, promover a transferência de elétrons do NADPH no citoplasma para o NBT que, ao ser reduzido indiretamente, precipita-se no interior das células espermáticas, apresentando coloração mais escura nos locais de formação de ROS (ESFANDIARI et al., 2003).

Apesar de os espermatozóides possuírem enzimas antioxidantes citoplasmáticas como glutatona peroxidase e superóxido dismutase, a sua concentração é pequena e restrita ao citoplasma do espermatozóide de mamíferos, limitando o grau de proteção (ZINI et al., 1993). Entretanto, os fluidos epididimários e ejaculatórios possuem elevada concentração de enzimas antioxidantes e inibidores de espécies reativas (SIKKA, 1996; STOREY, 1997), cujo objetivo é inativar a elevada concentração de ROS, compensando a deficiência de enzimas citoplasmáticas do espermatozóide (DONELLY et al., 1999) e preservando somente a quantidade necessária para manter a função celular normal, uma vez que ROS tem sido implicado em muitos mecanismos celulares e pode regular a expressão genética, principalmente relacionada a proteínas antioxidantes em situações de grande estresse oxidativo (JONES et al., 2000).

Todos os componentes celulares incluindo lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares são potenciais alvos de estresse oxidativo. A extensão do dano induzido, depende

da natureza e da quantidade de ROS envolvido e da duração de sua exposição, além de fatores extracelulares como temperatura, tensão de oxigênio e composição do ambiente externo, como íons, proteínas e inibidores de ROS (AGARWAL et al., 2003).

Acredita-se que elevada produção de ROS por células com excesso de citoplasma residual esteja relacionada à presença da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que induz a produção de NADPH e, em contrapartida, estimula a produção de ROS (AITKEN et al., 1995). O potencial para NADPH produzir grandes quantidades de ROS também está presente em células normais. Se a viabilidade de nucleotídeos é aumentada pela adição de NADPH ao meio contendo espermatozóides normais, pode estimular a produção de ROS (AITKEN et al., 1995). Outra explicação para o aumento da produção de ROS é o potencial dos elétrons oriundos de mitocôndrias danificadas (STOREY, 1997).

ROS tem uma tendência a reação em cadeia, uma vez que, por ser portador de um elétron desemparelhado, reagirá com outro componente para gerar outro elétron desemparelhado. Dessa forma, é fundamental quebrar essa reação em cadeia através da formação final de produtos não radicais (SIES, 1993). Antioxidantes que quebrem essa cadeia, como α -tocoferol (vitamina E), inibem a peroxidação lipídica em membranas através de inibidores de radicais peróxil (RO^{\bullet}) e alcóxil (ROO^{\bullet}). Por outro lado, outro mecanismo de defesa antioxidante é a prevenção da excessiva produção de ROS, que inibe o início da reação em cadeia (SIES, 1993). Em contrapartida, hidroperóxidos lipídicos são estáveis sob condições fisiológicas até que entrem em contato com metais de transição (tais de ferro ou cobre), gerando radicais alcóxil e peróxil, que continuam a reação em cadeia dentro da membrana, e propagam o dano através da célula (AITKEN et al., 1994).

2.5 Diluentes para congelação

Substâncias diluidoras são utilizadas com o objetivo de proteger as células espermáticas de efeitos deletérios do processo de congelação visando estabilizar a membrana plasmática, atuar como crioprotetores, fornecer nutrientes necessários ao metabolismo espermático e servir como tampão para manutenção do pH (JASKO, 1994).

Experimentos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a eficiência de diversos diluentes utilizados na criopreservação do sêmen de cão (OLAR et al., 1989; SILVA et al., 1997; SILVA et al., 2000). A maioria dos protocolos utiliza diluidores a base de gema de ovo, Tris, citrato de sódio (ANDERSEN, 1975; ENGLAND, 1993; SILVA et al., 2000) ou leite desnatado (KENNEY, 1975), acrescido de frutose (MOURA et al., 2002) ou de glucose

nos procedimentos de refrigeração e congelamento do sêmen de cão (PROVINCE et al., 1984; MOURA et al., 1999; MOURA et al., 2002).

A gema de ovo possui lipoproteínas de alta e baixa densidade (BACILA, 2003) que protegem as células espermáticas de danos decorrentes do processamento de criopreservação (MOUSSA et al., 2002; MOURA et al., 2002).

A gema de ovo, comumente utilizada na composição de diluidores, é constituída de duas partes: a gema branca, contendo maior quantidade de proteínas do que de lipídios, e a gema amarela, com elevado teor de lipídios. As lipoproteínas presentes no ovo são classificadas como de baixa (LDL) e de alta densidade (HDL) ou lipovitelinas. Livetinas, fosvitinas, flavoproteínas ou proteínas hidrossolúveis, vitaminas lipossolúveis como A, D, E e K, vitaminas hidrossolúveis, como as do complexo B, carotenóides como luteína, zeaxantina, criptoxantina, caroteno, enzimas como peptidase, catalase, amilase, fosfatase, esterase, proteinase, além de componentes inorgânicos como magnésio (Mg), ferro (Fe), enxofre (S), cloro (Cl), fósforo (P), entre outros, estão presentes na composição da gema do ovo (BACILA, 2003).

Substâncias como albumina, encontrada na clara de ovo, têm sido utilizadas como agente protetor de membranas de espermatozóides em humanos (TWIGG et al., 1998; VISCONTI & KOPF, 1998). Os constituintes da clara do ovo se apresentam distribuídos de forma não homogênea, entre os cordões de ovomucina, tendo sido determinadas diversas proteínas como ovoalbumina, ovotransferrina, ovomucoide, ovomucina, G₁-globulina, G₂-globulina, G₃-globulina, ovomacroglobulina, ovoglicoproteína, flavoproteína-apoproteína, ovoinibidor, avidina e um pequeno percentual de proteínas ainda não identificadas (BACILA, 2003). A ovoalbumina representa 54% das proteínas presentes na clara, podendo desempenhar o papel de proteção em células criopreservadas (BACILA, 2003). Trabalhos relataram a utilização de albumina sérica bovina (TWIGG et al., 1998) e albumina sérica humana (ARMSTRONG et al., 1998) com o objetivo de prevenir a geração exacerbada de ROS.

O leite apresenta em sua composição sais minerais, lactose, uréia, ácido láctico, creatinina, aminoácidos, vitaminas, cálcio, sódio, cloretos e fosfatos (BACILA, 2003), e juntamente com o Tris são bastante utilizados como meio diluidor de sêmen.

Para evitar danos causados aos espermatozóides pela congelamento, tem sido empregados crioprotetores como o glicerol e etilenoglicol, que atuam prevenindo ou reduzindo a formação de cristais de gelo, intra e extracelular, que poderiam provocar danos aos componentes celulares (CAVALCANTI et al., 2002).

2.6 Substâncias antioxidantes

Com o objetivo de reduzir os danos oxidativos causados pela alta concentração de ROS, alguns pesquisadores têm adicionado substâncias antioxidantes ao sêmen de suínos (PEÑA et al., 2003; ROCA et al., 2004), bovinos (BILODEAU et al., 2001), ovinos (MAXWELL & STOJANOV, 1996; UPRETI et al., 1997), aves (BRÈQUE et al., 2003) e homem (HUGHES et al., 1998; DONNELLY et al., 1999; ROLF et al., 1999; AGARWAL & SALEH, 2002).

Em espermatozóides da espécie humana, tanto o ascorbato, quanto o α -tocoferol têm sido reportados em aumentar a integridade do DNA basal, em virtude de reduzir a produção de espécies reativas e danos causados por sua alta concentração (FRAGA et al., 1991; DONNELLY et al., 1999). O ascorbato é conhecido por atuar como um inibidor de uma grande variedade de ROS, o que explica sua habilidade de se contrapor ao efeito do H_2O_2 nos danos causados ao DNA e na produção de ROS (SIES et al., 1992).

A vitamina E, pertence a um grupo de antioxidantes lipossolúveis (tocoferóis e tocotrienóis) encontrados em óleos de certas plantas, constituindo-se no maior, senão o único antioxidante de membrana. Entretanto, sua concentração na membrana plasmática dos espermatozóides é muito baixa, geralmente igual ou menor que 0,05-0,1 nmol/mg de proteína, ou seja, menos de 1 para cada 1000-2000 fosfolipídeos das membranas (SIKKA, 2004).

Estudos prévios têm demonstrado que o α -tocoferol está presente em pequenas quantidades no plasma seminal, protegendo as células de mamíferos do estresse oxidativo através da regeneração deste agente antioxidante pelo ascorbato (KAGAN et al., 1992). Esses dois antioxidantes (ascorbato e α -tocoferol) agem sinergicamente com o objetivo de prevenir a peroxidação lipídica, tendo sido observado bons resultados quando se utilizaram essas duas vitaminas em conjunto, reduzindo a produção de ROS induzida pelo H_2O_2 (DONNELLY et al., 1999).

Foi observado que a criopresevação de sêmen ovino causa alterações semelhantes à capacitação nos espermatozóides (WATSON, 1995), apresentando padrão de ligação a clortetraciclina (CTC) semelhante àquele observado em espermatozóides capacitados *in vivo*. Esses achados sugerem que o impedimento do transporte espermático através da cérvix pode ser um dos fatores responsáveis pela reduzida taxa de fertilidade observada após a inseminação artificial em ovelhas, com sêmen criopreservado (GILLAN & MAXWELL, 1999).

Diversas substâncias desempenham papel protetor contra os efeitos tóxicos causadas por agentes endógenos, originados nos processos fisiológicos, e/ou exógenos, durante manipulação ou criopreservação de amostras de sêmen utilizadas nas técnicas de reprodução assistida (CARVALHO et al., 2002; SIKKA, 2004). Antioxidantes naturais como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), citocromo C (CHc) e glutathione peroxidase (GP) são encontradas no sêmen (MAXWELL & STOJANV, 1996) e podem atuar na remoção de ROS, como o óxido nítrico (ON) que, apesar de ser um mediador importante de vários sistemas, quando gerado em excesso determina toxicidade e danos aos espermatozóides (FRIDOVICH, 1998; LOPES et al., 1998; CARVALHO et al., 2002).

A atuação dos antioxidantes pode ser efetivada através da prevenção, interceptação ou reparação. A prevenção utiliza-se de íons metálicos como ferro e cobre, através da reação de quelação; a interceptação (enzimática e não enzimática) impede a formação de espécies reativas ou a transferência de função de reações, ou a intervenção de enzimas, observada na reparação (SIES, 1993).

Concentrações adequadas de antioxidantes podem proteger as células germinativas masculinas (THIELE et al., 1995; ESKENAZI et al., 2005) contra problemas endógenos de oxidação (FRAGA et al., 1991). Os antioxidantes encontrados em maiores concentrações no plasma seminal do homem são o Ascorbato, o Urato e os grupos tióis (LEWIS et al., 1997). Entretanto, de acordo com Rolf et al. (1999), pacientes tratados com elevadas doses de vitaminas C e E não apresentaram mudanças nos parâmetros relacionados a células reprodutivas durante o tratamento. Contudo, estes autores relataram melhora nestes parâmetros após abstinência prolongada destas substâncias fornecidas freqüentemente, evidenciando que superdosagens podem exercer efeitos danosos as células reprodutivas. Observou-se que doses elevadas destas substâncias podem provocar também a desestabilização da cromatina (GRIVEAU & LANNOU, 1994). Em estudo realizado com ratos, Yousef et al. (2003) detectaram redução da produção de radicais livres após utilização de Ácido Ascórbico e Vitamina E. A Carnitina, composto orgânico nitrogenado, também pode ser empregado como antioxidante, por sua eficiência no transporte de ácidos graxos através da membrana mitocondrial (VICARI & CALOGERO, 2001).

Antioxidantes sintéticos como hidroxitolueno butilato (BHT), utilizado na congelção de sêmen suíno, mostrou-se eficiente na proteção dos espermatozóides, reduzindo a peroxidação lipídica (ROCA et al., 2004). Da mesma forma, a pentoxifilina adicionada a amostras de sêmen humano e de eqüino, aumentaram a motilidade e o vigor espermático (MARQUES et al., 2002).

3 EXPERIMENTOS

3.1 EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VITAMINA C E TROLOX NA VIABILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES CRIOPRESERVADOS DE CÃES

*Effect of different concentrations of vitamin C and Trolox
on the viability of frozen sperm of dogs*

Zoraide Fernandes Coletto; Andréia Fernandes de Souza; Karina de Melo Berinson;
Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Júnior; Patrícia Fernandes Jasset;
Maria Madalena Pessoa Guerra

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

RESUMO

Antioxidantes funcionam como agentes protetores dos espermatozóides impedindo a formação de espécies de oxigênio reativo (ROS) e conseqüente peroxidação lipídica, aumentando a motilidade e o vigor, e evitando os danos provocados ao DNA. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de diferentes concentrações de vitamina C e Trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E) na viabilidade de células espermáticas de cães submetidas aos processos de criopreservação. Frações espermáticas de três cães foram colhidas, avaliadas e divididas em cinco alíquotas para diluição, de acordo com os grupos experimentais: G1= Tris-gema (Controle); G2 = Tris-gema + 1200 μ M de vitamina C; G3= Tris-gema + 2400 μ M de vitamina C; G4= Tris-gema + 100 μ M de Trolox e G5= Tris-gema + 200 μ M de Trolox. As amostras foram congeladas, armazenadas em nitrogênio líquido e descongeladas após uma semana. Após descongelação, a motilidade espermática foi significativamente superior ($P < 0,05$) entre os grupos G1 (controle), G2 (1200 μ M de vitamina C) e G5 (200 μ M de Trolox). O vigor, a integridade do acrossoma e do DNA, bem como o percentual de células espermáticas, coradas com Nitroblue Tetrazolium não diferiram entre os grupos experimentais. Conclui-se que a vitamina C (1200 μ M) e Trolox (200 μ M) podem ser utilizadas para congelação de sêmen de cão, todavia outros trabalhos devem ser realizados, visando estudar os efeitos da adição de substâncias antioxidantes vitamina C e Trolox, isoladas ou em conjunto, no procedimento de criopreservação do sêmen de cão utilizando diferentes curvas de congelação e diluentes.

Palavras-chave: Viabilidade espermática, antioxidante, vitamina C, Trolox, congelação.

ABSTRACT

Antioxidants act as protective agents of spermatozoa preventing the reactive oxygen species formation and consequent lipidic peroxidation rising the motility and the vigor and avoiding the damage provoked to the DNA. The aiming of this work was to evaluate the effect of different concentrations of vitamin C and Trolox on the viability of dog sperm cells submitted to the cryopreservation process. Spermatic fractions of three dogs were harvested, evaluated and divided into five aliquots to dilution, according to the experimental groups: G1= Tris- egg yolk (Control); G2 = Tris-egg yolk + 1200 μ M of vitamin C; G3= Tris-egg yolk + 2400 μ M of vitamin C; G4= Tris-egg yolk + 100 μ M of Trolox e G5= Tris-egg yolk + 200 μ M of Trolox. The samples were frozen, stored on liquid nitrogen and thawed after 1 week. After thawing, the motility was significantly higher ($P < 0.05$) among G1 (control), G2 (1200 μ M of vitamin C) and G5 (200 μ M of Trolox) groups. The vigor, motility, acrosomal and DNA integrity, as well as the percentage of sperm cells stained with nitroblue tetrazolium were not different among experimental groups. Our results indicate that vitamin C (1200 μ M) and Trolox (200 μ M) can be used to freezing dog semen. However, other works should be done aiming to study the effect of addition of these antioxidant substances, alone or combined, on the cryopreservation process of the dog semen using different freezing rate and diluents.

Key words: Sperm viability, antioxidant, vitamin C, Trolox, freezer.

INTRODUÇÃO

Os procedimentos de criopreservação do sêmen oferecem muitas vantagens, principalmente quando se objetiva realizar avaliação genética e programas de seleção animal. Entretanto, em muitas espécies, o maior obstáculo à utilização dessa biotecnologia está relacionado aos danos causados à membrana espermática durante refrigeração, congelação e descongelação, reduzindo a motilidade e a viabilidade das células espermáticas e, conseqüentemente, a fertilidade após a inseminação artificial, quando comparada àquela obtida utilizando sêmen fresco (SALAMON & MAXWELL, 1995; SHANNON & VISHWANATH, 1995).

Acredita-se que as crioinjúrias causadas às células espermáticas interfiram no transporte e na sobrevivência espermática no sistema genital da fêmea (SALAMON & MAXWELL,

1995). A membrana plasmática do espermatozóide é considerada o local primário de danos durante a criopreservação (WATSON, 1995), como consequência da diluição (ASHWORTH et al., 1994; SILVA et al., 2002), da alteração da osmolaridade (NOILES et al., 1995) e da variação de temperatura durante os procedimentos de criopreservação (ROBERTSON et al., 1990; NOILES et al., 1995).

Alguns estudos demonstraram que o procedimento de criopreservação influencia a composição lipídica e organizacional da membrana plasmática de espermatozóides, determinando assimetria e danos ultra-estruturais, predispondo os espermatozóides a defeitos morfológicos como anormalidade ou perda do acrossoma (HINKOVSKA-GALCHEVA et al., 1989), assim como do poder de fecundação em várias espécies (ASHWORTH et al., 1994; MAXWEL & JOHNSON, 1997; BAILEY et al., 2000; HOLT, 2000; WATSON, 2000), inclusive na canina (RIJSSELAERE et al., 2002).

Atualmente sabe-se que espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}), se ligam facilmente a diversos compostos orgânicos, desencadeando a peroxidação lipídica da membrana plasmática com dano irreversível à célula decorrente do desequilíbrio entre a produção e o consumo de substâncias oxidantes e antioxidantes, que resulta em estresse oxidativo (AITKEN et al., 1993; De LAMIRANDE et al., 1997; SHNIZER et al., 2003; GUERRA et al., 2004).

Vários métodos são utilizados para mensurar a quantidade de ROS na superfície da membrana celular, bem como intra ou extracelular. Atualmente, os métodos de mensuração indireta mais usados são os testes de quimioluminescência com luminol (SHARMA e AGARWAL, 1996; GRIVEAU et al., 1998; IRVINE et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2001) e o de redução de Nitroblue tetrazolium (SALEH e AGARWAL, 2002; ZINI et al., 2002; ESFANDIARI et al., 2003).

As vitaminas encontram-se presentes no sêmen desempenhando função antioxidante. O ácido ascórbico (vitamina C) protege as células contra mutações gênicas, doenças genéticas, geração de células defeituosas, ocorrência de câncer ou doenças decorrentes de idade avançada (FRAGA et al., 1991; KAGAN et al., 1992; OMU et al., 1999; ROLF et al., 1999; ESKENAZI et al., 2005). A vitamina E, antioxidante primário do sistema espermático, pode ser utilizada na forma natural (lipossolúvel), através da alimentação (ROLF et al., 1999; JONES et al., 2000; YOUSEF et al., 2003), ou sintética (hidrossolúvel), adicionada ao sêmen (DONNELLY et al., 1999; BALL et al., 2001; PEÑA et al., 2003). Estas substâncias funcionam como agentes protetores dos espermatozóides impedindo a formação de ROS e

conseqüente peroxidação lipídica, promovendo também o incremento da motilidade e do vigor, e evitando os danos provocados ao DNA em ratos (HSU et al., 1998; YOUSEF et al., 2003), suínos (KITAGAWA et al., 2004), eqüinos (MARQUES et al., 2002) e humanos (AITKEN e BAKER, 2004; AITKEN et al., 2004). Apesar do efeito de substâncias antioxidantes serem reconhecidas quando utilizadas como suplemento alimentar ou diluente do sêmen, sua aplicação nos procedimentos de criopreservação do sêmen de cão ainda não está suficientemente elucidado.

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de diferentes concentrações de vitamina C e Trolox na viabilidade de células espermáticas criopreservadas de cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram selecionados três cães da raça Cocker Americano, pertencentes a canil privado. Os animais possuíam idade variando entre 2 e 4 anos, com fertilidade comprovada. Os animais foram mantidos em boxes individuais, alimentados com ração uma vez ao dia, além de terem livre acesso a água.

Colheita e análise de sêmen

O sêmen foi obtido através de manipulação digital, uma vez por semana, durante três semanas. Cada ejaculado foi colhido em cálice graduado, sendo utilizada apenas a fração rica em espermatozóides. Volume, cor e viscosidade, foram macroscopicamente avaliadas, enquanto a motilidade (percentual de espermatozóides móveis) e vigor espermático (*status* da motilidade espermática), com escore de 0 (sem movimento) a 5 (movimento progressivo rápido) foram avaliadas em microscópio óptico, de acordo com o CBRA (1997).

A análise de integridade do acrossoma espermático foi realizada através da técnica de Roth et al. (1998), modificada ao se utilizar 0,02 mg de lectina obtida de *Arachis hypogaea* marcada com isotiocianato de fluoresceína em 350 µL de PBS (Solução PNA). Foram colocados 5µL da amostra em lâmina e, após secagem durante 5 minutos, armazenou-se em caixas fechadas a 4 °C pelo período de 2 a 4 semanas. Para coloração, foram adicionados 30 µL da solução PNA no centro da lâmina preparada com a amostra de sêmen e

homogeneizou-se até que a solução cobrisse uma grande área. As lâminas foram colocadas na geladeira em caixas cobertas com papel alumínio durante 20 minutos. Após coloração, as lâminas foram mergulhadas em 50 mL de PBS (sem antibióticos) e secadas em caixas de isopor. A seguir, adicionaram-se 5µL da solução UCD (5 mg de azida sódica em 0,5 mL de PBS + 5mg de p-fenilenediamina a 0,1 % + 4,5 mL de glicerol, pH 8,0) na lâmina, a qual foi coberta com lamínula. As lâminas foram avaliadas em microscópio fluorescente (filtro“MF”) com objetiva de 100X. Foram analisadas 200 células espermáticas classificadas como: a) acrossoma intacto quando a cabeça e/ou região apical apresentaram-se coradas em verde brilhante; b) acrossoma parcialmente reagido se a cabeça apresentou-se mesclada de verde fluorescente; c) acrossoma reagido quando a cabeça apresentou-se sem coloração verde ou foi observada apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça dos espermatozoides.

A integridade do DNA dos espermatozoides foi analisada através da técnica de fluorescência laranja de acridine (acridine orange-AO), de acordo com Evenson et al. (1999). Após a colheita, procedeu-se a diluição de 10 µL das amostras de sêmen em 1mL de solução Tris (0,01M), NaCl (0,15M) e EDTA (0,001M) com 7,4 de pH, em tubos de microcentrífuga, os quais foram transportados em nitrogênio líquido e mantidos a temperatura de -20 °C até análise. No momento da avaliação, após descongelação a 37 °C, 100µL da suspensão de espermatozoides foram colocados em tubos de microcentrífuga imersos em gelo e adicionaram-se 100µL de solução ácido-detergente (0,1% de Triton X-100, 0,08N de HCL e 0,15M de NaCl com pH 1,4). Após 30 segundos, foram adicionados 400µL de solução corante de AO (370mL de ácido cítrico monohidratado 0,1 M + 630µL de Na₂HPO₄ [dibásico] 0,2 M + 0,372g de EDTA [disódico] + 8,77g de NaCl, pH 6,0) e avaliadas 200 células em microscópio de fluorescência (filtro“MF”), de acordo com a seguinte interpretação: a) Células coradas em verde = DNA íntegro; b) Células coradas em laranja ou vermelho = DNA danificado.

Na avaliação do grau de estresse oxidativo sofrido pelos espermatozoides utilizou-se o teste de coloração com Nitroblue Tetrazolium (NBT), de acordo com Esfandiari et al. (2003). Alíquotas de sêmen foram diluídas em NBT (10,0%), na proporção de 1:1 (v:v). A suspensão obtida foi incubada durante 30 minutos em temperatura de 37 °C e, a seguir, mantida por período de 30 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 250g durante 5 minutos. Descartado o sobrenadante, a lâmina foi preparada utilizando o pellet e submetendo à secagem em temperatura ambiente. A análise foi

efetivada através da leitura de 200 células em microscópio de contraste de fase, sob imersão, de acordo com a presença ou ausência de formazana: 1- formazana ocupando 50% ou menos da cabeça ou peça intermediária (+); 2- formazana ocupando mais de 50% da cabeça ou peça intermediária (++); 2 - ausência de formazana na cabeça ou peça intermediária (-).

A concentração espermática de cada amostra de sêmen foi determinada através da câmara de Neubauer. Foram utilizadas amostras que apresentaram concentração $\geq 200 \times 10^6$ espermatozoides/mL, motilidade espermática $\geq 80\%$ e vigor ≥ 3 . Após análise, realizou-se o Pool do ejaculado dos animais, o qual foi dividido em cinco alíquotas e diluídas em diferentes concentrações de vitamina C ou Trolox.

Diluição do sêmen

Utilizou-se o diluidor constituído por 3,28 g de Tris-hidroximetil-aminometano, 1,78 g de ácido cítrico monohidratado e 1,25 g de D-frutose, dissolvidos em 100 mL de água destilada. Vinte por cento da solução foi substituída por gema de ovo. O diluidor foi dividido em cinco porções iguais, acrescido de diferentes concentrações de vitamina C ou Trolox, e 7,0% de glicerol, constituindo os diferentes grupos experimentais: G1= Tris-gema (Controle); G2= Tris-gema + 1200 μ M de vitamina C; G3= Tris-gema + 2400 μ M de vitamina C; G4= Tris-gema + 100 μ M de Trolox[®] (análogo hidrossolúvel da vitamina E) e G5= Tris-gema + 200 μ M de Trolox.

Congelamento do sêmen

As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL na concentração de 200×10^6 células espermáticas e congeladas em máquina (TK-3000), na curva de 0,25 °C/minuto até 5 °C, de 20 °C/minuto até -5 °C, assim como de 20 °C/minuto até -120 °C. A seguir, as palhetas foram imersas e armazenadas em nitrogênio líquido a -196 °C. Após uma semana, as amostras foram descongeladas a temperatura de 37 °C durante 30 segundos e diluídas em Tris (1:1; v:v) antes de serem analisadas quanto a motilidade, vigor, integridade do acrossoma e integridade do DNA e grau de estresse oxidativo.

Análise estatística

Para análise dos dados, foram obtidas as medidas estatísticas média, desvio padrão e utilizados o teste de Kruskal-Wallis. No caso de diferenças significativas, foram utilizados testes de comparações pareadas do referido teste através da utilização do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

O sêmen fresco dos cães apresentou coloração branca com viscosidade leitosa. O volume médio das frações ricas em espermatozóides foi de 1,07 mL, com concentração espermática média de $376,83 \times 10^6$ espermatozóides/mL. A motilidade espermática apresentou média de $86,10 \pm 3,48$ % e o vigor $3,48 \pm 0,19$.

Após a congelação (Tabela 1) não se observou diferença na motilidade espermática entre os grupos G1 (controle), G2 (1200 μ M de vitamina C) e G5 (200 μ M de Trolox), mas foram superiores ($P < 0,05$) àqueles obtidos nos grupos G3 (2400 μ M de vitamina C) e G4 (100 μ M de Trolox). O vigor espermático médio após a congelação (Tabela 1) não apresentou diferença entre os diferentes grupos experimentais. Detectou-se em todas as amostras que espermatozóides inicialmente imóveis apresentavam movimentos em poucos segundos.

Tabela 1 – Motilidade e vigor espermático de sêmen canino descongelado, a 37 °C por 30 segundos, submetido à diluição em Tris-gema acrescido de diferentes concentrações de Vitamina C e Trolox

Grupos Experimentais	Parâmetro	
	Motilidade (%) Média \pm dp	Vigor (0-5) Média \pm dp
G1	$63,33 \pm 15,28^a$	$3,33 \pm 0,58$
G2	$40,00 \pm 10,00^a$	$3,00 \pm 0,00$
G3	$15,00 \pm 7,07^b$	$2,67 \pm 0,58$
G4	$25,00 \pm 7,07^b$	$3,00 \pm 0,00$
G5	$70,00 \pm 10,00^a$	$2,67 \pm 0,58$

G1= Tris-gema (Controle); G2= Tris-gema + 1200 μ M de Vitamina C; G3= Tris-gema + 2400 μ M de Vitamina C; G4= Tris-gema + 100 μ M de Trolox e G5= Tris-gema + 200 μ M de Trolox. Letras diferentes na mesma coluna indicam $P < 0,05$.

Observou-se também que as células espermáticas apresentaram-se inicialmente agrupadas, mas se desprendiam apresentando movimentos aparentemente normais. Vale ressaltar que, embora raramente, células espermáticas pertencentes ao G1 (Controle) apresentaram aglutinação cabeça a cabeça.

A avaliação da integridade do acrossoma das células espermáticas, antes da congelação, demonstrou que $71,67 \pm 2,03$ % apresentaram-se intactos (Figura 1a). Todavia, após a descongelação houve redução neste parâmetro com valores que variaram de $28,17 \pm 5,30$ (G4) a $39,33 \pm 7,29$ (G5), sem diferença entre os grupos (Tabela 2). Vale ressaltar que células classificadas com acrossoma intacto apresentaram-se coradas apenas na região acrossomal, enquanto células portadoras de acrossoma reagido apresentaram faixa verde fluorescente na região equatorial da célula ($17,36 \pm 7,07$ %) ou sem coloração ($17,09 \pm 2,35$ %).

Antes da congelação, a análise de DNA apresentou $100,00 \pm 0,00$ % de integridade das células espermáticas. Após os procedimentos de congelação/dcongelação não foi observada diferença significativa entre os grupos (Tabela 2; Figura 1b).

Tabela 2 –Porcentual de células espermáticas com integridade de acrossoma e de DNA, no sêmen canino descongelado submetido à diluição em Tris-gema acrescido de diferentes concentrações de Vitamina C e Trolox

Grupos Experimentais	Espermatozóides	
	Acrossoma intacto Média \pm dp	DNA intacto Média \pm dp
G1	$34,83 \pm 7,69$	$99,33 \pm 1,15$
G2	$38,67 \pm 6,17$	$100,00 \pm 0,00$
G3	$33,17 \pm 3,79$	$100,00 \pm 0,00$
G4	$28,17 \pm 5,30$	$100,00 \pm 0,00$
G5	$39,33 \pm 7,29$	$99,33 \pm 1,15$

G1= Tris-gema (Controle); G2= Tris-gema + $1200\mu\text{M}$ de Vitamina C; G3= Tris-gema + $2400\mu\text{M}$ de Vitamina C; G4= Tris-gema + $100\mu\text{M}$ de Trolox e G5= Tris-gema + $200\mu\text{M}$ de Trolox

Após descongelação, a avaliação do grau de estresse oxidativo das células espermáticas revelou não haver diferença entre os grupos ($P > 0,05$) constituídos por diferentes concentrações de Vitamina C ou Trolox (Tabela 3; Figura 2). Foram constatados maiores percentuais de espermatozóides sem depósito de formazana na cabeça e na peça intermediária.

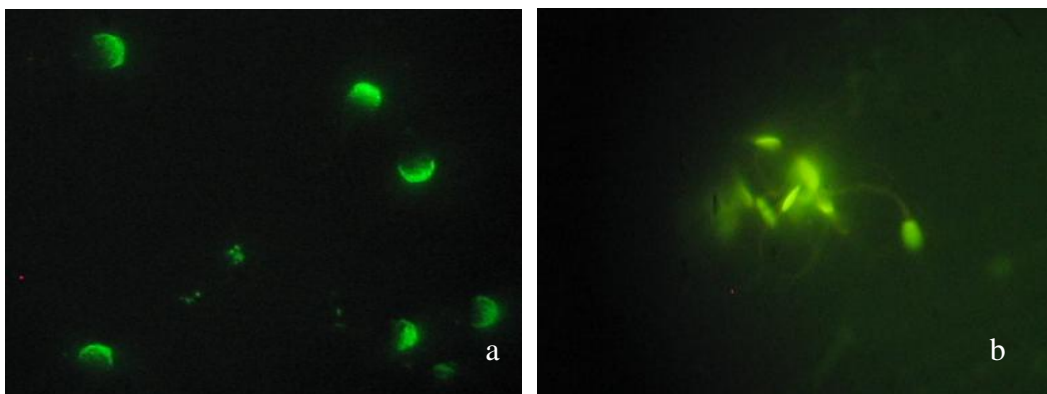


Figura 1- Espermatozoides de cão da raça Cocker Americano com acrossoma (a) e DNA (b) íntegros após congelamento em diluidor Tris-gema com 200 μ M de Trolox.

Tabela 3 – Porcentual de espermatozoides de cães apresentando formação de formazana na cabeça e cauda, após congelamento utilizando Tris-gema acrescido de diferentes concentrações de vitamina C e Trolox

Parâmetros	Grupos Experimentais				
	G1	G2	G3	G4	G5
	Média \pm dp	Média \pm dp	Média \pm dp	Média \pm dp	Média \pm dp
Cabeça formazana -	80,17 \pm 8,10	66,83 \pm 7,97	65,17 \pm 9,83	65,17 \pm 5,84	72,67 \pm 0,58
Cabeça formazana +	5,17 \pm 1,53	7,33 \pm 5,39	8,00 \pm 3,91	4,67 \pm 2,02	7,83 \pm 0,76
Cabeça e PI formazana +	4,17 \pm 1,61	5,67 \pm 2,25	5,50 \pm 3,91	6,83 \pm 2,84	4,67 \pm 2,88
PI formazana ++	7,00 \pm 6,38	17,17 \pm 2,02	18,67 \pm 1,53	16,83 \pm 7,59	15,67 \pm 0,76
PI formazana +	8,83 \pm 0,76	12,50 \pm 4,92	10,83 \pm 6,01	13,67 \pm 6,01	7,67 \pm 2,36
PI formazana -	80,00 \pm 7,86	64,67 \pm 8,01	65,00 \pm 8,67	62,67 \pm 6,53	72,00 \pm 0,50

PI= Peça Intermediária; G1= Tris-gema (Controle); G2= Tris-gema + 1200 μ M de Vitamina C; G3= Tris-gema + 2400 μ M de Vitamina C; G4= Tris-gema + 100 μ M de Trolox e G5= Tris-gema + 200 μ M de Trolox

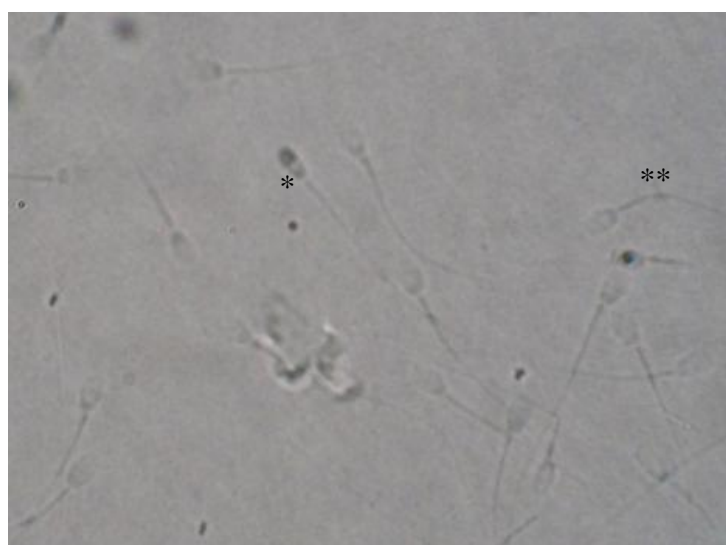


Figura 2 - Espermatozoides de cão da raça Cocker Americano com coloração de formazana na cabeça (*) e sem depósito de formazana na cauda (**) após congelamento em diluidor Tris-gema.

DISCUSSÃO

Após serem liberados dos testículos, os espermatozóides sofrem profundas alterações na sua capacidade funcional durante o processo de maturação no epidídimo, através de modificações de proteínas moduladas espontaneamente ou por sinais do ambiente (FORD, 2004). Na cauda do epidídimo, os espermatozóides são encontrados em estado imóvel e caracterizados por baixa concentração intracelular de cAMP e cálcio, bem como apresentam sua inata capacidade de produzir ROS suprimida (WHITE & AITKEN, 1989). Essa condição é revertida durante os estágios iniciais da capacitação, onde se constata aumento nas concentrações de cAMP e cálcio intracelular, tendo início a produção de ROS, e, em consequência, os espermatozóides desenvolvem a forma altamente vigorosa de motilidade conhecida como hiperativação (AITKEN et al., 1995).

Paradoxalmente, as células sob condições aeróbicas requerem oxigênio (O₂) para dar suporte à vida, todavia seus metabólitos (ROS) originados principalmente de sua atividade metabólica normal (De LAMIRANDE et al., 1997), podem modificar suas funções e/ou sobrevivência (De LAMIRANDE & GAGNON, 1995). Quando submetidos a uma condição de estresse oxidativo decorrentes da retenção do excesso de citoplasma residual na peça intermediária ou da redução na quantidade de antioxidantes (AITKEN & KRAUSZ, 2001), os espermatozóides sofrem disfunção através de diferentes mecanismos, como peroxidação de lipídeos de membrana plasmática (BALL & VO, 2002), inibição do metabolismo (WANG et al., 2003), da motilidade (JONES et al., 1979) e da capacidade fertilizante (PASQUALOTTO et al., 2000; AGARWAL & SAID, 2003).

Acredita-se que os lipídeos das membranas plasmáticas e acrossomal são os principais alvos de ataque de ROS (SHARMA & AGARWAL, 1996; AITKEN, 1997). A peroxidação lipídica da membrana celular causada pelo estresse oxidativo determina substancial perda de ácidos graxos insaturados (OCHSENDORF, 1999), com consequente redução na fluidez, responsável pela fusão espermatozóide-ovócito, na atividade das enzimas reguladoras que se ligam ao Ca²⁺ e na motilidade espermática (JONES et al., 1979).

Durante as manipulações espermáticas em laboratório, especialmente na ausência do plasma seminal, antioxidantes celulares são importantes para preservar a motilidade e a habilidade dos espermatozóides de sofrerem capacitação e reação do acrossoma (ARMSTRONG et al., 1998). Neste estudo, os valores de motilidade espermática, encontrados nos grupos G1 (controle) e G5 (200µ de Trolox) foram superiores àqueles relatados por Moura et al. (2002), que obtiveram 41,54 % de células móveis utilizando Tris-

gema como diluente, sem adição de substâncias antioxidantes. Estes resultados, também evidenciaram que a adição de antioxidantes (vitamina C e Trolox) nas concentrações utilizadas, não protegeu as membranas espermáticas da peroxidação lipídica, e conseqüentemente, não promoveram aumento na motilidade destas células, uma vez que os grupos G2 e G5 obtiveram percentuais semelhantes ao grupo controle que utilizou apenas Tris-gema.

Em contrapartida, constatou-se que as concentrações de 2400 μM de vitamina C (G3) e 100 μM de Trolox (G4) devem ter interferido nos mecanismos fisiológicos das células espermáticas reduzindo a motilidade espermática, sugerindo que a concentração de 2400 μM de vitamina C (G3) pode ter inibido a fisiologia normal das células ao promover desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante total dos espermatozóides, decorrente da adição excessiva de substâncias antioxidante ao sêmen (SHARMA & AGARWAL, 1996; OCHSENDORF, 1999; SALEH & AGARWAL, 2002). Possivelmente, a adição de 200 μM de Trolox (G4) pode ter sido insuficiente para se contrapor aos efeitos negativos de elevada produção de ROS durante o processo de congelação, cuja extensão dos danos depende não somente da natureza e da quantidade, mas também do momento e da duração de exposição ao oxidante associado a fatores extracelulares, como temperatura, tensão de oxigênio e ambiente (AGARWAL et al., 2003), resultando em morte celular (SHARMA et al., 1999).

Hay et al. (1997) obtiveram motilidade, pós-descongelação, de $32,00 \pm 17,00 \%$ e $55,00 \pm 13,00\%$, respectivamente, nas amostras refrigeradas a 28 e 12 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ utilizando Tris-gema, valores inferiores aos dos grupos G1 ($63,33 \pm 15,28 \%$) e G5 ($70,00 \pm 10,00$) obtidos neste experimento. Entretanto, as amostras do grupo G2 (1200 μM de vitamina C), cuja motilidade foi de $40,00 \pm 10,00\%$, também podem ser utilizadas na inseminação artificial de cadelas, de acordo com as recomendações de Concannon e Battista (1989) e Silva et al. (1996), ao aconselharem a utilização do sêmen de cão que apresentem valor mínimo de 30% de motilidade.

As médias de vigor espermático de todos os grupos experimentais foram inferiores aos observados por Moura et al. (2002), após a congelação utilizando Tris-gema (3,85 pontos) como diluente, sem adição de antioxidantes. Esse fato pode ser justificado pela diferença nos glicolipídios presentes nas células dos animais utilizados (sem raça definida X raça Cocker Americano), ou a composição do diluente, estando possivelmente ligadas aos efeitos

elétricos, ao reconhecimento e proteção da membrana em condições desfavoráveis de pH e ao ataque enzimático (ALBERTS et al., 1997).

Foram superiores aos encontrados por Cavalcanti et al. (2002), que observaram 2,58 pontos de vigor, também utilizando Tris gema e glicerol a 7%. Entretanto, neste trabalho, a refrigeração e congelação do sêmen, foram realizadas em máquina com controle de temperatura, que deve ter proporcionado maior vigor às células, diferindo do procedimento realizado por Cavalcanti et al. (2002), ao utilizarem a refrigeração convencional em geladeira. Os resultados deste estudo, mostraram que a adição de diferentes concentrações de antioxidantes (vitamina C e Trolox), não foi eficiente em promover menores danos oxidativos às células espermáticas, diferindo de Peña et al. (2003) ao observarem que a adição de Trolox na concentração de 200 μ M determinou maior motilidade às células espermáticas de suínos do que a concentração de 100 μ M.

Neste experimento, foram detectados espermatozóides com diferentes valores para vigor e motilidade nos diversos grupos experimentais, variando de oscilantes até hiperativados em um mesmo campo de observação, possibilitando afirmar que diferentes populações de espermatozóides originadas de distintos tempos de maturação são encontradas no ejaculado (ALBERTS et al., 1997; CUNNINGHAM, 2002). Além disso, estas constatações podem ser decorrentes de alteração semelhante à capacitação espermática induzida pela congelação, reduzindo a energia dos espermatozóides e a homogeneidade da população espermática (BAILEY et al., 2000).

Menores concentrações de ROS (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico) possuem papel importante na fisiologia espermática por induzir a hiperativação, a capacitação e a reação do acrossoma *in vitro* (De LAMIRANDE et al., 1997). No entanto, não se sabe qual o sistema enzimático responsável pela produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) espermático que esteja relacionado a essas atividades celulares. Acredita-se que uma oxidase encontrada na membrana plasmática do espermatozóide, bem como sua ativação durante a capacitação (De LAMIRANDE & GAGNON, 1995) e reação do acrossoma (AITKEN et al., 1995), esteja relacionada à proteína quinase C. Todavia, a localização e os requerimentos para a sua ativação ainda devem ser estabelecidos (De LAMIRANDE et al., 1997). Neste experimento, a análise de acrossoma utilizando FITC-PNA demonstrou não haver diferença na integridade das células entre os diferentes grupos, apesar de haver sido constatados valores numéricos mais elevados nas amostras suplementadas com 1200 μ M de vitamina C (G2) e 200 μ M de Trolox (G5), sugerindo que a adição de vitamina C em

concentração menor que $1200\mu\text{M}$ e de Trolox maior que $200\mu\text{M}$ poderia aumentar o percentual de células com acrossoma íntegro, decorrente de proteção antioxidante mais efetiva às células espermáticas (ARMSTRONG et al., 1998).

A ocorrência de células com região acrossomal corada de verde, indicando acrossoma intacto, confirma as observações feitas por Sirivaidyapong et al. (2000) de que a membrana acrossomal externa de espermatozóide de cão cora-se com FITC-PNA. Os resultados deste experimento corroboram com trabalhos nas espécies ovina (SUKARDI et al., 1997; VALCÁRCEL et al., 1997), suína e eqüina (SIRIVAIDYAPONG et al., 2000), ao indicarem o FITC-PNA como marcador de acrossoma íntegro. Em contrapartida, Rathi et al. (2001) relataram que, em espermatozóides de garanhão, os acrossomas não corados com FITC-PNA indicam acrossoma íntegro.

Um aspecto interessante a ser abordado foi a necessidade de se aumentar a concentração de lectina utilizada para avaliação da integridade do acrossoma, uma vez que na concentração recomendada por Roth et al. (1998), observou-se que poucos espermatozóides de cão apresentaram-se corados. Este fato pode ser explicado pela variação na composição e na fluidez das membranas das células espermáticas de diferentes espécies, decorrente da ausência ou reduzida concentração de canais iônicos ou de proteínas carreadoras (ALBERTS et al., 1997), afetando a afinidade bioquímica deste corante com a membrana espermática (CEROLINI et al., 2001; COLETO et al., 2001).

Como todas as células sob condições aeróbicas, os espermatozóides também produzem ROS originados, principalmente, de sua atividade metabólica normal (De LAMIRANDE et al., 1997). Tem sido proposto que essa produção, atua na regulação da maturação espermática, uma vez que Glutathione peroxidase (GPx) pode utilizar os grupos tióis de proteínas nucleares como alternativa para reduzir a glutathione (GSH). A geração de lipídeos peroxidados pelo ROS deve fornecer substrato para GPx promover a oxidação dessas proteínas e facilitar a condensação nuclear (AITKEN & VERNET, 1998).

Entretanto, vários estudos têm demonstrado que o processo de descongelamento celular causa danos oxidativos na membrana, decorrente do rápido aumento na utilização de oxigênio pelos espermatozóides após período de interrupção do metabolismo, determinando maior produção de espécies reativas (BALL et al., 2001; BALL & VO, 2002) e fragmentação de DNA (BAUMBER et al., 2003). Todavia, provavelmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que forma radical hidroxil altamente tóxicos (OH^-) e induz lesão ao DNA reduzindo o potencial fertilizante dos espermatozóides (SALEH & AGARWAL,

2002), seja o principal oxidante produzido durante os procedimentos de congelação e descongelação espermática.

Estudos recentes sugerem que a cromatina espermática ou DNA é uma importante medida da qualidade espermática com maior capacidade de diagnóstico e prognóstico de fertilidade (SALEH et al., 2003). Neste experimento, as células espermáticas de todos os grupos experimentais, independente da adição de vitamina C ou de Trolox, apresentaram quase 100,00% de integridade de DNA. O que leva a crer que a congelação pode ter determinado a produção de outro tipo de oxidante ou que a quantidade de H_2O_2 produzida não foi suficiente para causar danos, uma vez que apesar de haver sido constatada redução na motilidade espermática de espermatozóides pertencentes aos grupos G3 e G4, não se observou danos ao DNA destas células. Apesar de neste experimento não haver sido mensurada a concentração de agentes oxidantes, os resultados de DNA corroboram com os relatos de Donnelly et al. (1999), ao constatarem que a adição de ascorbato (300 e 600 μM) ao meio de preparação de sêmen humano não afetou a integridade de DNA, mas reduziu significativamente a produção de espécies reativas induzidas pelo H_2O_2 . Similarmente, α -tocoferol na concentração de 40 e 60 μM , inibiu a produção de ROS induzida pelo H_2O_2 , de modo dose-dependente, mas não teve efeito na concentração basal de ROS.

A condição de estresse oxidativo nos espermatozóides é causada pela elevada concentração de ROS produzida por gametas imaturos, anormais (BALL et al., 2001; GIL-GUZMAN et al., 2001) ou normais submetidos a congelação (WANG et al., 1997; BILODEAU et al., 2000; BALL et al., 2001; CEROLINI et al., 2001; CHATTERJEE & GAGNON, 2001), assim como baixa concentração de antioxidante no plasma seminal (YEUNG et al., 1998). Nos espermatozóides de cães submetidos a criopreservação, acrescido de diferentes concentrações de substâncias antioxidantes, foi observado pequeno percentual de células com redução do corante NBT. Estes relatos possibilitaram interpretar que espermatozóides anormais colhidos de homens inférteis (SALEH & AGARWAL, 2002; ZINI et al., 2002; ESFANDIARI et al., 2003) apresentam maior grau de estresse oxidativo do que aqueles colhidos de cães com fertilidade comprovada e submetidos a congelação.

Por outro lado, estudos têm mostrado que o α -tocoferol está presente em pequenas quantidades no plasma seminal e protege as células de mamíferos de estresse oxidativo através da regeneração desse antioxidante pelo ascorbato (KAGAN et al., 1992). Esses dois antioxidantes (ascorbato ou α -tocoferol) agem sinergicamente com o objetivo de proteger da ocorrência de peroxidação lipídica, demonstrando resultados satisfatórios quando

utilizados conjuntamente, reduzindo a produção de ROS induzida pelo H₂O₂ (DONNELLY et al., 1999).

O NADPH citoplasmático, produzido pela oxidação de glucose através da via hexose monofosfato, serve como doador de elétrons. O sistema oxidase disponível no citoplasma, auxilia na transferência de elétrons da NADPH para o NBT reduzindo-o em formazana (BAEHNER et al., 1976). Assim, a reação do NBT indiretamente, reflete a atividade produtora de ROS no citoplasma da célula e, além disso, pode auxiliar a determinar a origem celular de ROS em uma suspensão heterogênea como o ejaculado. Neste experimento, constatou-se que espermatozóides dos grupos controle (G1) e suplementados com 200µM de Trolox (G5), apesar de não diferirem estatisticamente dos demais grupos, apresentaram menos células coradas por NBT na cabeça e peça intermediária, evidenciando que a adição de 1200µM (G2) e 2400µM (G3) de Vitamina C e de 100µM de Trolox (G4) não foram eficientes em inibir a produção de ROS pelas células espermáticas, mesmo que em pequena concentração.

A decisão em analisar particularmente a cabeça e a peça intermediária, deveu-se ao fato de haverem sido encontradas várias formas de combinações entre os parâmetros observados, levando a avaliar aqueles que se apresentaram com maior frequência nas amostras congeladas de sêmen de cão. O grande número de células que apresentou peça intermediária corada por NBT pode estar relacionado com a afirmativa de que a peça intermediária de espermatozóides dos animais domésticos é a principal região produtora de ROS (FORD, 2004). Explicando a diferença entre os achados de formação de formazana na cabeça ou no excesso de citoplasma residual encontrado na peça intermediária de espermatozóides de homens portadores de infertilidade (SALEH & AGARWAL, 2002; ESFANDIARI et al., 2003).

Com base nos resultados em que a adição de vitamina C e Trolox, nas concentrações de 1200µM e 200µM, respectivamente, ao diluente Tris-gema utilizado no sêmen congelado de cão preservou a motilidade espermática, conclui-se que a Vitamina C (1200µM) e Trolox (200µM) podem ser utilizadas para congelação do sêmen de cão, todavia outros trabalhos devem ser realizados visando estudar o efeito da adição destas substâncias antioxidantes, isoladas ou em conjunto, assim como utilizando diferentes curvas de congelação e diluentes no procedimento de criopreservação do sêmen de cão.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R.A.; SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Hum. Reprod. Update.**, v. 9, p. 331-345, 2003.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil. Steril.**, v. 4, p. 829-843, 2003.
- AITKEN, R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 3, p. 169-173, 1997.
- AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reprod., Fertil. Devel.**, v. 16, p. 581-588, 2004.
- AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, p. 497-506, 2001.
- AITKEN, R.J.; VERNET, P. Maturation of redox regulation mechanisms in the epididymis. **J. Reprod. Fertil.** (Suppl S3), p. 109-118, 1998.
- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 97, p. 441-450, 1993.
- AITKEN, R.J.; PATERSON, M.; FISHER, H. et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **J. Cell Sci.**, v. 180, p. 2017-2025, 1995.
- AITKEN, R.J.; RYAN, A.L.; BAKER, M.A. and McLAUGHLIN, E. A Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 36, n. 8, p. 994-1010, 2004.
- ALBERTS B.; BRAY D.; LEWIS J. et al. **Biologia Molecular da Celula**. Artes Medicas, 3^a ed., Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 1997, 1294p.
- ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTRON, W.J. et al. Antioxidant potential of human serum albumin: role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology. **J. Androl.**, v. 19, p. 412-419, 1998.
- ASHWORTH P.J.C.; HARRISON R.A.; MILLER N.G.A. et al. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. **Reprod., Fertil. Dev.**, v. 6, p. 173-180, 1994.

BAEHNER, R.L.; BOXER, L.A.; DAVIS, J. The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v. 48, p. 309-313, 1976.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J-F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.

BALL, B.B.; VO, A.T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. **J. Androl.**, v. 23, p. 259-269, 2002.

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, p. 508-515, 2001.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **J. Androl.**, v. 24, p. 621-628, 2003.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 55, p. 282-288, 2000.

CAVALCANTI, M.C.O.; MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P. et al. Cryoprotector action of the glycerol and ethylene glycol in the freezing of the dog semen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 26, n. 3, p. 174-176, 2002

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F. et al. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v. 121, p. 395-401, 2001.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. **Mol., Reprod. Dev.**, v. 59, p. 451-458, 2001.

COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; SOUZA, D.M.B. et al. Comparação da eficiência de técnicas de avaliação de espermatozoides caprinos criopreservados. **Ciênc. Vet. Tróp.**, v. 4, p. 221-228, 2001.

CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. **Canine semen freezing and artificial insemination**. In: KIRK, R.W. (ed), Current Veterinary Therapy X. Philadelphia: WB Saunders Company, p.1247-1258, 1989.

CUNNINGHAM, J.G. **Gestação e parto**. In: Tratado de Fisiologia Veterinária. Editora Guanabara Koogan, 3^a. Ed., p. 409-416, Rio de Janeiro, RJ, 2002.

De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 18, p. 487-495, 1995.

- De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Rev. Reprod.**, v. 2, p. 48-54, 1997.
- 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.
- ESFANDIARI, N.; SHARMA R.K.; SALEH R.A. et al. Utility of the Nitroblue Tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leucocytes and spermatozoa. **J. Androl.**, v. 24, n. 6, p. 862-870, 2003.
- ESKENAZI, B.; KIDD, S.A.; MARKS, A.R. Et al. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. **Hum. Reprod.**, v. 20, n. 4, p.1006-1012, 2005.
- EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Hum. Reprod.**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.
- FORD, W.C.L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Hum. Reprod. Update**, v. 10, p. 387-399, 2004.
- FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p.11003-11006, 1991.
- GIL-GUZMAN, E.; OLLERO, M.; LOPEZ, M.C. et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Hum. Reprod.**, v. 16, p. 1922-1930, 2001.
- GRIVEAU, J.F.; GRIZARD, G.; BOUCHER, D. et al. Influence of oxygen tension on function of isolated spermatozoa from ejaculated of oligozoospermic patients and normozoospermic donors. **Hum. Reprod.**, v. 13, p. 3108-3113, 1998.
- GUERRA M.M.P. Importância dos oxidantes na fisiologia espermática. In: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 2005. **Proceedings...**Teresina, 2005. CD-ROOM.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel dos antioxidants na andrologia. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 20, n. 4, p.185-236, 2004.
- HAFEZ E.S.E. **Reprodução Animal**. 1995, 6^a. Ed., Manole, São Paulo, SP, 582p
- HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 26, p. 70-75, 1989.

- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.
- HSU, P.; LIU, M.; HSU, C. et al. Effects of vitamin E and /or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology**, v. 128, p. 169-179, 1998.
- IRVINE D.S.; TWIGG J.P.; GORDON E.L. et al. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. **J. Androl.**, v. 21, n. 1, p. 33-44, 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. **Fertil. Steril.**, v. 31, p. 531-537, 1979.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.M. **Patologia Veterinária**. Manole, São Paulo, SP, p.1223-1237, 2000.
- KAGAN V.E.; SERBINOVA E.A.; FORTE T. et al. Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. **J. Lipid Res.**, v. 33, p. 385-397, 1992.
- KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular. Uma introdução à patologia**. Elsevier Editora Ltda., São Paulo, SP, p. 561-597, 2004.
- KITAGAWA Y.; SUZUKI K.; YONEDA A. et al. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v. 62, p. 1186-1197, 2004.
- KOBAYASHI, H.; GIL-GUZMAN, E.; MAHRAN, A.M.; et al. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. **J. Androl.**, v. 22, p. 568-574, 2001.
- MARQUES A.; ARRUDA R.P.; CELEGHINI E.C.C. et al. Effects of ascorbic acid and pentoxifyline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.
- MOURA, C. S.; CAVALCANTI, M.C.O.; GUERRA, M.M.P. et al. Teste de avaliação *in vitro* e criopreservação do sêmen de cão utilizando diferentes diluidores. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v. 9, p. 102-106, 2002.
- NOILES, E.E.; BAILEY, J.L.; STOREY, B.T. Temperature dependence of the water permeability, L_p , of murine sperm shows a discontinuity between 4⁰ and 0⁰C. **Cryobiology**, v. 32, p. 220-238, 1995.
- OMU A.E.; FATINIKUN T.; MANNAZHATH N. et al. Significance of simultaneous determination of serum and seminal plasma α -tocopherol and retinol in infertile men by high-performance liquid chromatography. **Andrologia**, v. 31, p. 347-354, 1999.

- OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Hum. Reprod. Update**, v. 5, p. 399-420, 1999.
- PASQUALOTTO, F.F.; SHARMA, R.K.; NELSON, D.R. et al. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigations. **Fertil. Steril.**, v. 73, p. 459-464, 2000.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M. et al. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 78, p. 85-98, 2003.
- RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. et al. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 462-470, 2001.
- RIJSSELAERE T.; VAN SOOM A.; MAES D. et al. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p. 1669-1681, 2002.
- ROBERTSON, L.; BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. Effects of cold shock and phospholipase A₂ on intact boar spermatozoa and sperm head plasma membranes. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 26, p. 143-149, 1990.
- ROLF, C.; COOPER, T.G.; YEUNG, C.H. et al. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomised, placebo-controlled, double-blind study. **Hum. Reprod.**, v. 14, n. 4, p. 1028-1033, 1999.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M. et al. Heterologous in vitro fertilisation and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biol. Reprod.**, v. 58, p. 475-482, 1998.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 38, p. 1-36, 1995.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A.; NADA, E.A. et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. **Fertil. Steril.**, v. 79, p. 1597-1605, 2003.
- SHANNON, P.; VISHWANATH, R. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 39, p. 1-10, 1995.

- SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility (clinical review). **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.
- SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.R. et al. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Hum. Reprod.**, v. 14, n. 1, p. 2801-2807, 1999.
- SHNIZER, S.; KAGAN, T.; LANIR, A. et al. Modifications and oxidation of lipids and proteins in human serum detected by thermochemiluminescence. **Luminescence**, v. 18, p. 90-96, 2003.
- SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **Vet. Rec.**, v. 138, p. 154-157, 1996.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C. S.; UCHOA, D.C. et al. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on the semen freezing. **Vet. J.**, v. 164, p. 244-246, 2002.
- SIRIVAIDYAPONG, S.; CHENG, F.P.; MARKS, A. Effects of sperm diluents on the acrosome reaction in ca et al. nine sperm. **Theriogenology**, v. 53, p. 789-802, 2000.
- SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 46, p. 89-96, 1997.
- VALCÁRCEL, A.; HERAS, M.A.; PEREZ, L. et al. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing by simultaneous lectin/hoechst 33258 staining. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 45, p. 299-309, 1997.
- YEUNG, C.H.; COOPER, T.G.; DE GEYTER, M. et al. Studies on the origin of redox enzymes in seminal plasma and their relationship with results of in-vitro fertilization. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 4, p. 835-839, 1998.
- YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 76, p. 99-111, 2003.
- WANG, A.W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I. et al. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, p. 921-925, 1997.
- WANG, X.; SHARMA, R.K.; SIKKA, S.C. et al. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertil. Steril.**, v. 80, p. 531-535, 2003.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil Dev.**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WHITE, D.R.; AITKEN, R.J. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. **Gamete Res.**, v. 22, p. 163-177, 1989.

ZINI, A.; FISHER, M.A.; MAK, V. et al. Catalase-like and superoxide dismutase-like activities in human seminal plasma. **Urol. Res.**, v. 30, p. 321-323, 2002.

3.2 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE VITAMINA C E TROLOX NA VIABILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES CRIOPRESERVADOS DE CÃES, SUBMETIDOS A DUAS CURVAS DE CONGELAÇÃO

Vitamin C and Trolox addition to the viability of dog sperm cryopreserved in two freezing rates

Zoraide Fernandes Coletto, Andréia Fernandes de Souza, Crisitane Scavuzzi Moura,
Ellen Cordeiro Bento da Silva, Dimas da Costa Marques Filho,
Maria Madalena Pessoa Guerra

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

RESUMO

Taxas mais rápidas de refrigeração são necessárias para o sucesso da congelação de sêmen, possibilitando a recuperação de maior número de células viáveis e funcionais. Objetivando estudar a influência da adição de vitamina C e Trolox na viabilidade de espermatozóides de cães criopreservados em duas curvas de congelação, utilizou-se “Pool” com a segunda fração do sêmen de quatro cães. Após avaliação das características macroscópicas e microscópicas, as amostras foram divididas em quatro alíquotas e diluídas de acordo com os grupos experimentais: G1 = Tris-gema; G2 = Tris-gema + vitamina C (1200 μ M); G3 = Tris-gema + Trolox (200 μ M) e G4 = Tris-gema + vitamina C (1200 μ M) + Trolox (200 μ M). As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL na concentração de 200 X 10⁶ células espermáticas, criopreservadas em máquina utilizando duas curvas de congelação (Curva 1 = 0,25 $^{\circ}$ C/min até atingir 5 $^{\circ}$ C, seguido de uma rampa negativa, com decréscimo de 15 $^{\circ}$ C/min, e outra rampa negativa, com redução de 10 $^{\circ}$ C/min, até atingir – 120 $^{\circ}$ C, Curva 2 = -0,25 $^{\circ}$ C/min até 5 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C/min até -5 $^{\circ}$ C, -20 $^{\circ}$ C/min até –120 $^{\circ}$ C), e armazenadas em nitrogênio líquido. Após descongelação, a motilidade espermática não diferiu entre os grupos tratados com antioxidantes (vitamina C e Trolox) ou entre as duas curvas de congelação. Na curva 1, o percentual de acrossomas íntegros não diferiu entre os grupos controle (G1) e com vitamina C (G2), mas foram inferiores (P < 0,05) ao de vitamina C + Trolox (G4), enquanto na curva 2, não houve diferença entre os grupos. Ao se comparar curvas de congelação encontrou-se diferença significativa (P<0,05) no percentual

de acrossomas reagidos do G2 (vitamina C). Grandes percentuais de espermatozoides não apresentaram estresse oxidativo ou, quando ocorria, concentrava-se na peça intermediária das células. Conclui-se que se deve utilizar taxa de refrigeração de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ nas curvas negativas para congelamento de sêmen de cães e que a adição de vitamina C e Trolox em amostras diluídas em Tris-gema aumenta a viabilidade das células espermáticas congeladas a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ nas curvas negativas.

Palavras-chave: Temperatura, estresse oxidativo, antioxidante, sêmen.

ABSTRACT

Quicker cooling rates are necessary for the semen freezing success, making possible the recuperation of the most viable and functional cell numbers. Aiming to study the influence of the effect of vitamin C and Trolox addition on the cryopreserved dog sperm viability into two freezing curves, it was made the pool with the second semen fraction of four dogs. After evaluation of the macroscopic and microscopic characteristics, the samples were divided into four aliquots and diluted according to the experimental groups: G1 = Tris-egg yolk; G2 = Tris-egg yolk + vitamin C ($1200\mu\text{M}$); G3 = Tris-egg yolk + Trolox ($200\mu\text{M}$) and G4 = Tris-egg yolk + vitamin C ($1200\mu\text{M}$) + Trolox ($200\mu\text{M}$). The samples were packaged in $0,25\text{ mL}$ straws with the concentration of 250×10^6 sperm cells, cryopreserved in machine using two freezing curves (Curve 1 = $-0,25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$; Curve 2 = $-0,25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) and stored in liquid nitrogen. The spermatic motility after thawing did not differ among the groups treated with antioxidants (vitamin C and Trolox) or between the two freezing curves. The percentage of intact acrosome from curve 1, did not differ between the control group (G1) and with vitamin C (G2), but were inferior ($P < 0,05$) than the vitamin C + Trolox (G4), meanwhile in the Curve 2, there was no difference among the groups. Comparing the freezing curves, it was found a difference ($P < 0,05$) on the percentage of acrosome prevailed from G2 (vitamin C). Big percentages of sperm cells showed no oxidative stress or, when it occurred, it was concentrated in the middle section of the cells. It is concluded that it must be used cooling rate of $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ on the negative curves to freeze dog semen, and that the addition of vitamin C and Trolox in Tris – egg yolk diluted samples rise the viability of the spermatic cells frozen at $-150\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ on the negative curves.

Keywords: Temperature, oxidative stress, antioxidant, semen.

INTRODUÇÃO

Alguns estudos têm demonstrado que os efeitos osmóticos e de temperatura, determinados pelos procedimentos de congelação e descongelação, induzem grandes alterações no volume de água intracelular, resultando em considerável estresse mecânico nas membranas. Durante o procedimento de refrigeração, as células espermáticas são submetidas a temperaturas de 5 a 4 °C. Temperaturas entre 4 a 0 °C são responsáveis pela descontinuidade da permeabilidade da água na membrana espermática de camundongos, sugerindo que a transição da fase da membrana, associada a sua elevada fragilidade, ocorre nessa temperatura (NOILES et al., 1995).

Kumar et al. (2003) demonstraram que a curva de congelação de -30 °C/min é considerada ótima para minimizar os danos causados pelo processo de criopreservação, corroborando com os achados de Polge (1957), que originalmente reportou existir uma zona crítica de temperatura (entre -15 a -30 °C) responsável por danos aos espermatozóides, evidenciando que se a taxa de congelação for inadequada, todas as células serão danificadas quando submetidas à temperatura de -80 °C.

Espécies reativas de oxigênio (ROS), também conhecidas como agentes oxidantes, são radicais de oxigênio diatômico gerados através de sistemas biológicos aeróbicos (SHARMA & AGARWAL, 1996). As células, sob condições aeróbicas, requerem oxigênio (O₂) para dar suporte à vida, todavia seus metabólitos podem modificar suas funções e/ou sobrevivência (De LAMIRANDE & GAGNON, 1995). Normalmente observa-se equilíbrio entre a produção de espécies reativas e seus sistemas inibidores (SHARMA & AGARWAL, 1996; OCHSENDORF, 1999). Todavia, pode ocorrer estresse oxidativo nas células, *in vivo* e *in vitro*, como consequência de desequilíbrio entre a produção de ROS e as atividades antioxidantes encontradas no sêmen (SALEH & AGARWAL, 2002).

Durante o procedimento de criopreservação, a quantidade de ROS produzida pelos espermatozóides depende da temperatura a que os mesmos são submetidos, uma vez que a 22 ou 4 °C esses gametas produzem mais ROS do que quando incubados a 37 °C (WANG et al., 1997). Elevada produção de ROS após os procedimentos de refrigeração e congelação/dcongelação do sêmen bovino determinam alteração na estrutura e fluidez da membrana espermática causada pela peroxidação lipídica (AITKEN & CLARKSON, 1987), com consequente redução na motilidade espermática (CHATTERJEE & GAGNON, 2001).

Visando reduzir danos oxidativos causados pela elevada concentração de ROS, alguns pesquisadores têm adicionado substâncias antioxidantes em amostras de sêmen de

bovinos (BECONI et al., 1993; BILODEAU et al., 2001; FOOTE et al., 2002), ovinos (MAXWELL & STOJANOV, 1996; UPRETI et al., 1997; STEFANOV et al., 2004), caprinos (SINHA et al., 1996), suínos (PEÑA et al., 2003; ROCA et al., 2004) e humanos (HUGHES et al., 1998; DONNELLY et al., 1999). Substâncias antioxidantes como as vitaminas C e E mostraram-se eficazes quando utilizadas na dieta de humanos (AITKEN et al., 1993; De LAMIRANDE & GAGNON, 1993; GRIVEAU & LANNOU, 1997; HSU et al., 1998) e no sêmen de eqüinos (MARQUES et al., 2002). Entretanto, a quantidade necessária, a via de administração e os efeitos destas substâncias nas espécies de animais domésticos ainda não são totalmente conhecidos.

Objetivou-se com este trabalho estudar o efeito da adição de vitamina C e Trolox (análogo sintético da vitamina E) na viabilidade de espermatozóides de cães criopreservados utilizando duas curvas de congelamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Utilizaram-se quatro cães da raça Cocker Americano, pertencentes a canil privado, com idade entre 2 a 4 anos e diagnosticados através de avaliação prévia como férteis. Os animais foram mantidos em boxes individuais e alimentados com ração uma vez ao dia, e com acesso livre a água.

Colheita e análise de sêmen

A colheita de sêmen foi realizada através de manipulação digital, uma vez por semana, durante três semanas. Utilizou-se a fração rica em espermatozóides, colhida em cálice graduado, e avaliada macroscopicamente quanto a volume, cor e viscosidade. As características de motilidade (percentual de espermatozóides móveis) e vigor espermático (*status* da motilidade espermática), com escore de 0 (sem movimento) a 5 (movimento progressivo rápido), foram analisadas em microscópio óptico, de acordo com o CBRA (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal-1997).

Utilizou-se a técnica de Roth et al. (1998), modificada ao se utilizar 0,02 mg de lectina obtida de *Arachis hypogaea* marcada com isotiocianato de fluoresceína em 350 µL de PBS (Solução PNA), para avaliar a integridade do acrossoma espermático. Lâminas foram preparadas com 5µL da amostra e, após secagem durante 5 minutos, foram armazenadas em

caixas fechadas a 4 °C, durante 2 semanas. Para coloração, 30µL da solução PNA foram colocados no centro da lâmina anteriormente preparadas com a amostra de sêmen e, após homogeneização, as lâminas foram armazenadas em caixas cobertas com papel alumínio a temperatura de 5 °C, durante 20 minutos. Após coloração, as lâminas foram mergulhadas em 50 mL de PBS (sem antibióticos) e secadas em caixas de isopor. A seguir, sobre a lâmina foram adicionados 5µL da solução UCD (5 mg de Na azide em 0,5 mL de PBS + 5mg de p-fenilenediamina a 0,1 % + 4,5 mL de glicerol, pH 8,0), cobriu-se com lamínula, e avaliou-se em microscópio fluorescente (filtro“MF”) com objetiva de 100X. Foram analisadas 200 células espermáticas classificadas como: a) acrossoma intacto quando a cabeça e/ou região apical apresentaram-se coradas em verde brilhante; b) acrossoma parcialmente reagido se a cabeça apresentou-se mesclada de verde fluorescente; c) acrossoma reagido quando a cabeça apresentou-se sem coloração verde ou foi observada apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça dos espermatozóides.

A análise da integridade do DNA espermático foi realizada através da técnica de fluorescência Acridine Orange (AO), de acordo com Evenson et al. (1999). Alíquotas de 10 µL de sêmen foram diluídas em 1mL de solução Tris (0,01M), NaCl (0,15M) e EDTA (0,001M) com 7,4 de pH, colocadas em tubos de microcentrífuga, transportados em nitrogênio líquido e mantidos a temperatura de -20 °C até análise. Após descongelação a 37 °C, 100µL da suspensão de espermatozóides foram colocados em tubos de microcentrífuga imersos em gelo e adicionaram-se 100µL de solução ácido detergente (0,1% de Triton X-100, 0,08N de HCL e 0,15M de NaCl com pH 1,4). Trinta segundos após, foram adicionados 400µL de solução corante de AO (370mL de ácido cítrico monohidratado 0,1 M + 630µL de Na₂HPO₄ [dibásico] 0,2 M + 0,372g de EDTA [disódico] + 8,77g de NaCl, pH 6,0) e avaliadas 200 células utilizando filtro “MF” em microscópio de fluorescência, de acordo com a seguinte interpretação: a) Células coradas em verde = DNA íntegro; b) Células coradas em laranja ou vermelho = DNA danificado.

A análise do grau de estresse oxidativo dos espermatozóides, foi realizada através do teste de coloração com Nitroblue Tetrazolium (NBT), descrito por Esfandiari et al. (2003). Alíquotas de sêmen foram diluídas em NBT (10,0%), na proporção de 1:1 (v:v). Após incubação da suspensão em temperatura de 37 °C durante 30 minutos, a mesma foi mantida por período de 30 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 250g durante 5 minutos. Descartado o sobrenadante, o esfregaço foi preparado utilizando o pellet e submetendo à secagem em temperatura ambiente. A análise foi efetivada através da leitura

de 200 células em microscópio de contraste de fase, de acordo com a presença ou ausência de formazana na cabeça ou cauda espermática: 1- formazana ocupando 50% ou menos da cabeça ou cauda (+); 2- formazana ocupando mais de 50% da cabeça ou cauda (++); 3 - ausência de formazana (-) na cabeça ou cauda.

Determinou-se a concentração espermática de cada amostra de sêmen através da câmara de Neubauer. Somente foram utilizadas amostras que possuíam concentração $\geq 200 \times 10^6$ espermatozoides/mL e motilidade espermática $\geq 80\%$ e vigor ≥ 3 .

Diluição e congelamento do sêmen

O Pool do ejaculado dos animais foi diluído em Tris-gema (3,28 g de Tris-hidroximetil-aminometano, 1,78 g de ácido cítrico monohidratado e 1,25 g de D-frutose, dissolvidos em 100 mL de água destilada + 20% de gema de ovo) acrescido de diferentes concentrações de vitamina C ou Trolox e 7,0% de glicerol, constituindo os diferentes grupos experimentais: G1 = Tris-gema; G2 = Tris-gema + vitamina C (1200 μ M); G3 = Tris-gema + Trolox (200 μ M; análogo hidrossolúvel da vitamina E) e G4 = Tris-gema + vitamina C (1200 μ M) + Trolox (200 μ M).

As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25mL a uma concentração celular de 200×10^6 e criopreservadas em máquina utilizando duas curvas de congelamento: Curva 1 = 0,25°C/min até atingir 5 °C, seguido de uma rampa negativa, com decréscimo de 15 °C/min, e outra rampa negativa, com redução de 10 °C/min, até atingir -120 °C; Curva 2 = -0,25 °C/min até 5 °C, -20 °C/min até -5 °C, -20 °C/min até -120 °C, momento em que as amostras foram transferidas para nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico.

Após uma semana, as amostras foram descongeladas a temperatura de 37 °C durante 30 segundos e diluídas em Tris (1:1; v:v) antes de serem analisadas quanto a motilidade, integridade do acrossoma, integridade do DNA e grau de estresse oxidativo.

Análise Estatística

Para análise dos dados foram obtidas as medidas estatísticas: média e desvio padrão e utilizados os testes t-Student, com variâncias iguais ou desiguais, e o teste F (ANOVA). No caso de diferenças significantes entre os tratamentos, foram utilizados testes de comparações pareadas de Tukey. A verificação da hipótese de igualdade entre variâncias foi

realizada através do teste F para a finalidade específica. Os dados foram digitados na planilha Excel e o “software” utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SAS (Statistical Analysis System) na versão 8. A margem de erro, utilizada na decisão dos testes estatísticos, foi de 5%.

RESULTADOS

As amostras de sêmen colhidas dos cães apresentaram coloração branca com viscosidade leitosa. As frações ricas em espermatozóides possuíram volume médio 0,98 mL, com concentração espermática média de $443,33 \times 10^6$ espermatozóides/mL. A motilidade espermática média foi de $83,50 \pm 3,13\%$.

A motilidade espermática observada após descongelação das amostras (Tabela 1) apresentou valores que variaram de $50,00 \pm 10,00$ (G2) a $66,67 \pm 11,55$ % (G3), ao se utilizar a curva 1 de congelação. Todavia, nas amostras congeladas na curva 2 constatou-se médias de $50,00 \pm 10,00$ (G2) a $73,33 \pm 5,77$ % (G4), não apresentando diferença significativa entre os grupos tratados com diferentes substâncias antioxidantes (vitamina C e Trolox[®]), assim como entre as duas curvas de congelação utilizadas na máquina.

Tabela 1 – Motilidade espermática de amostras de sêmen de cães da raça Cocker Americano diluídas em Tris-gema suplementadas com vitamina C e Trolox e submetidas a duas curvas de congelação

Grupos Experimentais	Motilidade (%)	
	Curva 1 Média \pm dp	Curva 2 Média \pm dp
G1	$66,67 \pm 5,77$	$73,33 \pm 5,77$
G2	$50,00 \pm 10,00$	$50,00 \pm 10,00$
G3	$66,67 \pm 11,55$	$66,67 \pm 15,28$
G4	$56,67 \pm 5,77$	$70,00 \pm 10,00$

dp= desvio padrão; G1= Tris-gema (Controle); G2= Tris-gema + 1200 μ M de vitamina C; G3= Tris-gema + 200 μ M de Trolox; G4= Tris-gema + 1200 μ M de vitamina C + 200 μ M de Trolox; Curva 1 = -0,25°C/min até 5 °C, -15 °C/min até -5 °C, -10 °C/min até -120 °C; Curva 2 = -0,25 °C/min até 5 °C, -20 °C/min até -5 °C, -20 °C/min até -120 °C.

A avaliação do acrossoma (Tabela 2; Figura 1a) nas amostras de sêmen criopreservadas demonstrou que os grupos controle (G1) e suplementado com vitamina C (G2), quando congeladas na curva 1, não diferiram quanto ao percentual de espermatozóides que apresentaram acrossomas íntegros (cabeças coradas de verde), mas foram significativamente inferiores ($P < 0,05$) àquele suplementado com Trolox (G3) ou

vitamina C+ Trolox (G4). Todavia, na curva 2 não se constatou diferença significativa ($P>0,05$) entre os quatro grupos experimentais. Ao se comparar as duas curvas de congelação, também não se observou diferença significativa entre os grupos.

Quanto ao percentual de células espermáticas que não se coraram com FITC-PNA e foram classificadas como portadoras de acrossoma reagido, constatou-se não haver diferença entre as amostras suplementadas com vitamina C ou Trolox, nas duas curvas de congelação (1 e 2). Entretanto, ao se comparar as curvas de congelação encontrou-se diferença significativa ($P<0,05$) naquelas suplementadas com Trolox (G3).

Tabela 2 – Porcentual de células espermáticas, coradas com FITC-PNA nas diferentes regiões da cabeça, colhidas de cães da raça Cocker Americano diluídas em Tris-gema suplementadas com vitamina C e Trolox e submetidas a duas curvas de congelação

Variável	Curva	Grupos Experimentais			
		G1	G2	G3	G4
		Média ± dp	Média ± dp	Média ± dp	Média ± dp
Acrossoma intacto	1	15,50 ± 4,33 ^{bb}	16,50 ± 11,36 ^B	39,17 ± 1,26 ^{bA}	49,33 ± 24,62 ^A
	2	32,33 ± 3,33 ^a	34,67 ± 11,06	49,83 ± 5,30 ^a	37,33 ± 12,06
Acrossoma parcialmente reagido	1	39,50 ± 4,27	34,67 ± 8,14	34,83 ± 13,75	32,00 ± 18,38
	2	40,83 ± 8,98	44,33 ± 5,39	38,00 ± 2,29	36,67 ± 14,29
Acrossoma reagido	1	32,83 ± 7,97	43,33 ± 15,04 ^a	20,17 ± 15,25	15,83 ± 6,01
	2	18,33 ± 15,50	12,50 ± 7,37 ^b	6,00 ± 2,00	16,50 ± 4,50
Acrossoma parcialmente reagido	1	12,17 ± 10,73	5,50 ± 4,50	5,83 ± 2,75	2,83 ± 3,62
	2	8,50 ± 7,21	8,50 ± 3,04	6,17 ± 4,80	9,50 ± 5,63

dp= desvio padrão; G1= Tris-gema (Controle); G2= Tris-gema + 1200µM de vitamina C; G3= Tris-gema + 200 µM de Trolox; G4= Tris-gema + 1200µM de vitamina C + 200µM de Trolox; Curva 1 = -0,25°C/min até 5 °C, -15 °C/min até -5 °C, -10 °C/min até -120 °C; Curva 2 = -0,25 °C/min até 5 °C, -20 °C/min até -5 °C, -20 °C/min até -120 °C. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam $P<0,05$ entre grupos; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam $P<0,05$ entre curvas de congelação.

Os espermatozóides que apresentaram acrossomas parcialmente reagidos (mesclados de verde) ou reagidos (coloração verde fluorescente apenas na região equatorial da cabeça) não diferiram entre os grupos suplementados com vitamina C e Trolox ou entre as duas curvas de congelação utilizadas. Foi constatado que os espermatozóides de cães classificados como portadores de acrossoma intacto coraram-se em sua maioria na região

acrossomal. Enquanto aqueles que já haviam sofrido reação do acrossoma apresentaram-se, na sua grande maioria, sem coloração verde fluorescente em toda região da cabeça.

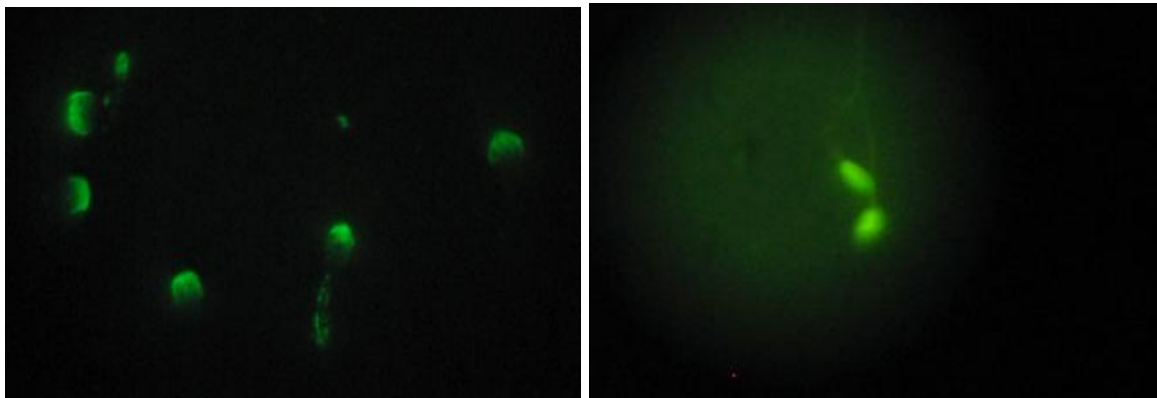


Figura 1 - Espermatozóides de cão da raça Cocker Americano com acrossoma (a) e DNA (b) íntegros após congelação em diluidor Tris-gema, na curva 2.

Ao teste de Laranja de Acridina (Figura 1b), constatou-se que 100,00% dos espermatozóides de cães se apresentaram com coloração verde fluorescente, antes e depois da congelação, indicando ausência de dano no DNA, nos grupos suplementados com vitamina C e Trolox e congelados nas duas curvas.

A avaliação do grau de estresse oxidativo das células espermáticas de cães (Figura 2) revelou que $83,50 \pm 3,43$ % não formaram formazana antes da congelação. Todavia, após congelação, os grupos tratados com antioxidantes, nas duas curvas de congelação (Tabela 3), tiveram maiores percentuais de espermatozóides sem formazana em toda a sua extensão ou apenas na cabeça, indicando não haver estresse oxidativo ou, quando ocorria, concentrava-se na peça intermediária das células.

O porcentual de células que apresentou cabeça e peça intermediária com (++) ou sem (-) depósito de formazana, não diferiram entre os grupos experimentais, nem entre as duas curvas de congelação utilizadas ($P > 0,05$). As células que não apresentaram formação de formazana na cabeça (-) ou que apresentaram formazana na cabeça (++) ou peça intermediária (+), não diferiram entre os grupos suplementados com antioxidantes, com exceção do grupo suplementado com vitamina C + Trolox (G4), ao evidenciarem diferença significativa ($P < 0,05$) entre as curvas de congelação, demonstrando que a curva 1 determinou maior grau de estresse oxidativo nas amostras. Células com formação de formazana na peça intermediária (++) demonstraram não haver diferença entre as curvas de

congelamento, mas diferiram significativamente entre os grupos experimentais suplementados com antioxidante, sendo que maior porcentual foi observado no grupo suplementado apenas com vitamina C (G2).

Tabela 3 – Porcentual de células espermáticas de cães da raça Cocker Americano coradas com formazana na cabeça e peça intermediária, indicando diferentes graus de estresse oxidativo após diluição em Tris-gema com vitamina C e Trolox, e submetidas a duas curvas de congelamento

Formação de Formazana	Curva	Grupos Experimentais			
		G1	G2	G3	G4
		Média ± dp	Média ± dp	Média ± dp	Média ± dp
Cabeça e PI (++)	1	1,17 ± 1,61	7,00 ± 2,00	4,50 ± 2,29	4,17 ± 2,52
	2	4,00 ± 3,12	4,67 ± 4,25	3,67 ± 1,76	3,00 ± 2,00
Cabeça e PI (-)	1	87,50 ± 3,50	74,00 ± 3,04	84,33 ± 9,70	78,67 ± 4,93
	2	90,33 ± 6,11	77,83 ± 5,06	91,67 ± 5,51	85,67 ± 9,07
Cabeça (++)	1	1,67 ± 1,76	3,83 ± 2,36	3,67 ± 2,08	3,50 ± 0,50 ^a
	2	2,33 ± 2,52	4,83 ± 3,62	3,17 ± 2,57	0,67 ± 0,29 ^b
Cabeça (-)	1	86,67 ± 5,77	80,67 ± 4,16	86,33 ± 7,52	80,83 ± 1,04 ^b
	2	87,33 ± 7,52	77,83 ± 5,11	88,33 ± 5,77	88,83 ± 1,61 ^a
PI (++)	1	6,17 ± 1,76 ^A	13,00 ± 1,00 ^B	5,83 ± 4,25 ^A	8,67 ± 1,76 ^{AB}
	2	3,50 ± 2,18	14,67 ± 7,08	3,50 ± 3,12	9,17 ± 5,01
PI (+)	1	5,17 ± 5,01	6,00 ± 1,32	5,33 ± 3,40	8,50 ± 1,80 ^a
	2	2,17 ± 2,02	2,83 ± 4,91	1,17 ± 1,26	2,17 ± 2,47 ^b

PI= peça intermediária; dp= desvio padrão; G1= Tris-gema (Controle); G2= Tris-gema + 1200µM de vitamina C; G3= Tris-gema + 200 µM de Trolox; G4= Tris-gema + 1200µM de vitamina C + 200µM de Trolox; Curva 1 = -0,25°C/min até 5 °C, -5 °C/min até -5 °C, -10 °C/min até -120 °C; Curva 2 = -0,25 °C/min até 5 °C, -20 °C/min até -5 °C, -20 °C/min até -120 °C. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam P<0,05 entre grupos; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam P<0,05 entre curvas de congelamento.



Figura 2 - Espermatozoides de cão da raça Cocker Americano com depósito de formazana na cabeça (*) e cauda (**) após congelamento em diluidor Tris-gema.

DISCUSSÃO

Parâmetros relacionados à estrutura e função espermática, como motilidade, integridade acrossomal e do DNA são úteis no exame da qualidade do sêmen congelado de cães. Neste experimento, constatou-se que o percentual de células móveis, obtidos nas duas curvas de congelamento, foi semelhante aos encontrados por Cavalcanti et al. (2002) e Silva et al. (2003) ou superiores aos de Moura et al. (2002), também utilizando Tris-gema e glicerol, evidenciando que a taxa de congelamento não interferiu na motilidade espermática. Estes resultados corroboram com Polge (1957), ao demonstrar que as temperaturas de -15 a -30 °C utilizadas para congelamento viabilizaram os espermatozoides criopreservados em ambiente abaixo de -80 °C.

Constatou-se também que a adição de vitamina C e Trolox, isoladas ou em associação, não determinou aumento na taxa de motilidade espermática, levando a supor que não houve aumento na produção de ROS, o tipo de oxidante produzido não foi sensível a ação antioxidante da vitamina C e Trolox ou as concentrações dos antioxidantes não foram eficientes para contrapor os efeitos negativos de elevada concentração de ROS, nas condições do experimento. Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que o grau de estresse oxidativo do sêmen depende da natureza e da quantidade de ROS produzido, assim como do momento e da duração de exposição, associado a temperatura, tensão de oxigênio e ambiente (AGARWAL et al., 2003). Apesar disto, os resultados de motilidade obtidos neste

experimento indicam, de acordo com os relatos de Concannon & Battista (1989) e Silva et al. (1996), que o procedimento de congelamento foi realizado de maneira adequada, uma vez que a motilidade é um parâmetro importante na avaliação do sêmen, em virtude de ser indispensável ao processo de fecundação, possibilitando a fusão e a penetração dos espermatozóides nos ovócitos (URNER & SAKKAS, 2003).

Comparativamente, com exceção dos grupos suplementados com vitamina C, os resultados de motilidade espermática, obtidos utilizando as curvas 1 e 2 deste experimento foram superiores aos $32,00 \pm 17,00\%$ e $55,00 \pm 13,00\%$ encontrados por Hay et al. (1997), respectivamente, nas amostras refrigeradas a 28 e 12 °C/min utilizando Tris-gema. Da mesma forma, observa-se superioridade nos resultados das duas curvas com a motilidade relatada por Ivanova-Kicheva et al. (1997), tanto na congelamento em pellets ($20,45 \pm 1,71\%$) quanto em tubos de alumínio ($25,90 \pm 1,76\%$), usando frutose na composição do diluente. Por conseguinte, mais estudos são necessários visando utilizar concentrações desta vitamina diferente daquela utilizada neste experimento. Ressalta-se que os parâmetros foram analisados por apenas um observador e obedecendo a todos os critérios definidos antes da realização do experimento.

Segundo Kumar et al. (2003), curvas de congelamento de -30 ou -50 °C/min determinaram valores similares de motilidade e viabilidade espermática no sêmen de bovinos, ovinos e suínos e que a escolha entre taxas de congelamento “rápida” ou “lenta” depende do tipo de célula e é determinada pela permeabilidade da água, área da superfície e volume aquoso da célula. Os resultados utilizando sêmen de cão ratificam esta afirmativa, uma vez que não se constatou diferença no percentual de células móveis submetidas a duas curvas de congelamento, apesar das taxas de congelamento terem sido menores (-20 °C/min ou -15 °C/min e -10 °C/min) e da adição de substâncias antioxidantes ao meio crioprotetor.

Processos de criopreservação danificam as organelas espermáticas e as membranas em particular (WATSON, 1995), induzindo alterações semelhantes a capacitação e reação do acrossoma na população de células que sobrevivem (WATSON, 1995; BAILEY ET AL., 2000). Desta forma, marcadores de membranas celulares são utilizados para avaliar a viabilidade espermática, com o Diacetato de carboxifluoresceína (COLETO, 2000) ou FITC-PNA, indicado para determinação do *status* acrossomal (ROTH et al., 1998). Sirivaidyapong et al. (2000) relataram que o FITC-PNA é um excelente marcador de acrossoma do espermatozóide canino, constituindo-se em importante ferramenta de avaliação da membrana espermática de espermatozóides desta espécie.

O aumento no porcentual de células apresentando acrossoma intacto (AI), ao se utilizar Trolox (G3) ou vitamina C + Trolox (G4) na curva 1, quando comparado ao controle (G1) ou tratado com vitamina C (G2), confirma que o Trolox (análogo da vitamina E) pode ser utilizado como substância antioxidante, uma vez que a vitamina E é conhecida como inibidor primário de espécies reativas encontradas em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos (SIKKA, 2004), assim como o seu sinergismo com a vitamina C (BUETTNER, 1993). Entretanto, a curva 2 (-20 °C) proporcionou maior integridade do acrossoma espermático do que a curva 1 (-15 °C/min e -10 °C/min), tanto nas células do grupo controle (G1) quanto nas suplementadas com Trolox (G3), demonstrando que, dependendo da taxa de congelamento, a adição de substâncias antioxidantes pode determinar maior viabilidade às células espermáticas.

Os menores porcentuais de células portadoras de acrossomas intactos no grupo suplementado apenas com vitamina C, na curva 1, poderiam também estar relacionados ao fato de que esta vitamina é instável em meio aquoso (BACILA, 2003). Todavia, visando reduzir este efeito negativo, a adição desta vitamina ao meio diluidor foi realizada pouco antes da colheita de sêmen, momento da colocação dos meios em banho-maria (37°C), tanto para as amostras criopreservadas nas duas curvas de congelamento.

Substâncias antioxidantes também têm sido utilizadas para reduzir injúrias no DNA celular (SHARMA & AGARWAL, 1996; SALEH & AGARWAL, 2002), causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) durante os processos de congelamento (SIKKA, 2004; GUERRA et al., 2004). Entretanto, apesar de haver sido identificada influência positiva da adição de Trolox, isolada ou em associação com a vitamina C, ao se utilizar a curva 1 de congelamento (-15 e -10 °C), a análise de integridade de DNA nuclear demonstrou que não houve lesão no material genético dos espermatozoides de cão submetidos a congelamento, tanto no grupo controle quanto nos tratados com antioxidantes, nas duas curvas de congelamento. Por conseguinte, outros estudos devem ser realizados visando avaliar também a integridade do DNA mitocondrial das células espermáticas submetidas aos efeitos da congelamento e, conseqüentemente, da elevada produção de ROS, assim como do benefício da adição de antioxidantes nestes procedimentos.

A análise do grau de estresse oxidativo através do teste de redução de NBT em espermatozoides criopreservados de cão, demonstrou a presença de formazana na região da cabeça dos espermatozoides (++) ou na peça intermediária, de forma contínua (++) ou intermitente (+). De maneira geral, independente do tipo de antioxidante ou da curva de congelamento utilizada, constatou-se maior porcentual de células sem formação de formazana

na cabeça e cauda espermática, evidenciando equilíbrio entre a quantidade de ROS produzida e a atividade antioxidante do ambiente espermático (SALEH & AGARWAL, 2002). Todavia, ao se constatar ausência de formazana apenas na cabeça (-), observou-se que no grupo suplementado com vitamina C + Trolox (G4), houve efeito positivo da curva 2 sobre o porcentual de espermatozóides sem estresse oxidativo.

Os resultados do teste de estresse oxidativo obtidos neste experimento, através da técnica de redução de NBT, constatou que a formazana na peça intermediária não estava vinculada com a presença de gota citoplasmática, diferindo dos relatos de Saleh & Agarwal (2002) e Esfandiari et al. (2003). Estes resultados podem ser explicados pelo fato de que em espermatozóides de homens, as avaliações geralmente são efetuadas em pacientes que apresentam problema de fertilidade, ao contrário dos cães que não apresentavam nenhum tipo de doença clínica ou reprodutiva. Além disso, pode estar relacionada com a afirmativa de Ford (2004), de que a produção de ROS nas células espermáticas de animais domésticos ocorre principalmente na peça intermediária.

Apesar das membranas espermáticas serem ricas em ácidos graxos poliinsaturados que as torna muito fluida e, ao mesmo tempo, muito susceptível a danos peroxidativos induzidos por espécies reativas (De LAMIRANDE & GAGNON, 1995; SIKKA, 2004), o elevado porcentual de células sem estresse oxidativo, caracterizado pela ausência de formação de formazana na cabeça e cauda, ratificam a elevada motilidade espermática dos grupos suplementados ou não com antioxidantes, nas duas curvas de congelamento. Entretanto, ao se associar estes resultados com os de células coradas de verde com FITC-PNA (acrossomas íntegros), onde se constatou efeito positivo da adição de Trolox e Trolox + vitamina C pode-se pensar que o efeito da congelamento danifica, inicialmente, a membrana celular, seguida de redução da motilidade e aumento de estresse oxidativo. Todavia, outros tipos e concentrações de substâncias antioxidantes devem ser adicionadas ao diluente de congelamento do sêmen de cães, visando conhecer o mecanismo de estresse oxidativo destas células e o seu sistema de proteção antioxidante, da mesma forma que estudos já realizados com espermatozóides do homem (AURICH et al., 1997; OMU et al., 1999; ESKENAZI et al., 2005).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados de integridade de acrossoma espermático, conclui-se que se deve utilizar taxa de refrigeração de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ nas curvas negativas para congelamento de

sêmen de cães e que a adição de vitamina C e Trolox em amostras diluídas em Tris-gema aumenta a viabilidade das células espermáticas congeladas a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ nas curvas negativas.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil. Steril.**, v. 79, p. 829-843, 2003.
- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 97, p. 441-450, 1993.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.81, p.459-469, 1987.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J. et al. **Biologia Molecular da Célula**. Artes Médicas, 3^a ed., Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 1997. 1294p.
- AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H. et al. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 185-192, 1997.
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J-F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.**, v. 21, p. 1-7, 2000.
- BECONI, M.T.; FRANCIA, C.R.; MORA, N.G. et al. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p. 841-851, 1993.
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C. et al. Thiols prevent H_2O_2 -mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-286, 2001.
- BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants, lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 300, p. 535-543, 1993.
- CAVALCANTI, M.C.O.; MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P. et al. Ação crioprotetora do glicerol e etilenoglicol no congelamento de sêmen de cão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 26, p. 174-176, 2002.
- CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 59, p. 451-458, 2001.

- COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; PAES BARRETO, M.B. et al. Fluorescence technique to evaluate the integrity of the membrane of cryopreserved spermatozoa. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 21, Punta del Este, Uruguay, **Proceedings...**, CD-ROOM, 2000.
- CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. **Canine semen freezing and artificial insemination**. In: KIRK, R.W. (ed), Current Veterinary Therapy X. Philadelphia: WB Saunders Company, p.1247-1258, 1989.
- De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 14, p. 157-166, 1993.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Hum. Reprod.**, v. 10, suppl.1, p. 15-21, 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, p. 505-511, 1999.
- ESFANDIARI, N.; SHARMA R.K.; SALEH R.A. et al. Utility of the Nitroblue Tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leucocytes and spermatozoa. **J. Androl.**, v. 24, n. 6, p. 862-870, 2003.
- ESKENAZI, B.; KIDD, S.A.; MARKS, A.R. et al. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. **Hum. Reprod.**, v. 20, n. 4, p.1006-1012, 2005.
- EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Hum. Reprod.**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.
- FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 71, p. 13-23, 2002.
- FORD, W.C.L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Hum. Reprod. Update**, v. 10, p. 387-399, 2004.
- GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. **Int. J. Androl.**, v. 20, p. 195-200, 1997.
- GUERRA M.M.P. Importância dos oxidantes na fisiologia espermática. In: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 2005. **Proceedings...**Teresina, 2005. CD-ROOM.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 20, p. 185-236, 2004.

GUERRA, M.M.P.; PEREIRA, R.J.T.A.; OLIVEIRA, M.A.L. Utilização do azul de tripam/giemsas para avaliar dois métodos de recuperação espermática de sêmen caprino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 21, p. 64-66, 1997.

HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J. et al. Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v. 48, p. 1329-1342, 1997.

HSU, P.; LIU, M.; HSU, C. et al. Effects of vitamin E and /or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology**, v. 128, p. 169-179, 1998.

HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; MCKELVEY, V.J. et al. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Hum Reprod.**, v. 13, p. 1240-1247, 1998.

IVANOVA-KICHEVA, M.G.; BOBADOV, N.; SOMLEV, B. Cryopreservation of canine semen in pellets and IN 5-ML aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, v. 48, p. 1343-1349, 1997.

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.

MARQUES A.; ARRUDA R.P.; CELEGHINI E.C.C. et al. Effects of ascorbic acid and pentoxifyline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.

MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reprod. Fertil.**, v. 8, p.1013-1020, 1996.

MOURA, C. S.; CAVALCANTI, M.C.O; GUERRA, M.M.P. et al. Teste de avaliação *in vitro* e criopreservação do sêmen de cão utilizando diferentes diluidores. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v. 9, p.102-106, 2002.

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.

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Hum. Reprod. Update**, v. 5, p. 399-420, 1999.

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

- POLGE, C. Low temperature storage of mammalian spermatozoa. **Proc. Roy. Soc. Lond.**, v. 147, p. 488-508, 1957.
- 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. **J. Androl.**, v. 25, p. 397-405, 2004.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M. et al. Heterologous in vitro fertilisation and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biol. Reprod.**, v. 58, p. 475-482, 1998.
- SALEH, RA.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. **J. Androl.**, v. 23, p. 737-752, 2002.
- SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, p. 835-850, 1996.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **J. Androl.**, v. 25, p. 5-18, 2004.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C. et al. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v. 59, p. 821-829, 2003.
- SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen sêmen. **Vet. Rec.**, v. 138, p. 154-157, 1996.
- SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K. et al. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 41, p. 237-243, 1996.
- SIRIVAIYAPONG, S.; CHENG F.P.; MARKS, A. et al. Effects of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. **Theriogenology**, v. 53, p. 789-802, 2000.
- STEFANOV, R.; ANGELOVA, M.; STEFANOVA, T. et al. Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103 improves ram spermatozoa functions in vitro. **Andrologia**, v. 36, p. 51-56, 2004.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E. et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 48, p. 269-278, 1997.
- URNER, F.; SAKKAS, D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 125, p. 17-26, 2003.

VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 1-6, 1998.

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

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

3.3 VIABILIDADE ESPERMÁTICA PÓS-CONGELAÇÃO DE SÊMEN CANINO DILUÍDO EM TRIS-GEMA OU KENNEY, SUPLEMENTADO COM ANTIOXIDANTES

Viability of dog sperm cells cryopreserved with Tris – egg yolk or Kenney and antioxidants

Zoraide Fernandes Coletto, Andréia Fernandes de Souza, Karen Mascaro Gonçalves da Silva, Patrícia Fernandes Jasset, Mariana Diel de Amorim, Maria Madalena Pessoa Guerra

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

RESUMO

Substâncias diluidoras são utilizadas com o objetivo de proteger as células espermáticas de efeitos deletérios do processo de congelação. Objetivando estudar a viabilidade de espermatozóides de cães criopreservados utilizando os diluentes Tris-gema e Kenney adicionados com vitamina C e Trolox, colheu-se o sêmen de quatro reprodutores da raça Cocker Americano, com idade variando entre 2 e 4 anos, com fertilidade comprovada. O sêmen foi colhido através de manipulação peniana digital e o pool foi dividido em duas alíquotas diluídas em Tris-gema ou Kenney. A seguir, a porção referente a cada diluente foi dividido e acrescido de substâncias antioxidantes, de acordo com o grupo experimental: G1= diluente (Controle); G2 = diluente +1200 μM de vitamina C; G3= diluente +200 μM de Trolox; G4= diluente + 1200 μM de vitamina C + 200 μM de Trolox. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL na concentração de 200×10^6 células espermáticas, criopreservadas em máquina de congelação e armazenadas em nitrogênio líquido. Após descongelação, observou-se que amostras diluídas em Tris-gema suplementadas com Vitamina C e Trolox (G4) apresentaram motilidade espermática superior ($P < 0,05$) àquelas diluídas com vitamina C (G2) ou Trolox (G3), separadamente. Amostras de sêmen diluídas em Tris-gema, suplementadas com vitamina C + Trolox (G4), apresentaram maior porcentual de integridade do acrossoma ($50,33 \pm 11,25\%$; $P < 0,05$) do que os demais grupos experimentais. O grupo controle (G1) de amostras diluídas em Kenney apresentaram maior porcentual ($P < 0,05$) de células íntegras do que aquelas diluídas em Tris-gema. Observou-se maior porcentual de células ($P < 0,05$) com cabeça e cauda apresentando formação de formazana (++) nas amostras suplementadas com Trolox (G3) e diluídas com Tris-gema

quando comparada àquelas diluídas em Kenney. A constatação de cabeça e cauda sem coloração com formazana não diferiu entre os grupos diluídos em Tris-gema e Kenney, mas aqueles diluídos com Tris-gema apresentaram menor porcentual ($P < 0,05$) no grupo G2 (Trolox). Conclui-se que o diluente Kenney é mais efetivo na preservação da viabilidade das células espermáticas de cão submetidas a congelação e que a suplementação da vitamina C associada a Trolox, análogo da vitamina E, minimiza os efeitos deletérios da criopreservação do sêmen sobre a integridade do acrossoma espermático de amostras diluídas em Tris-gema.

Palavras-chave: Diluente, vitamina C, Trolox, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Diluent substances are used with the objective of protecting the sperm cells from deleterious effects on the freezing process. Aiming to study the viability of the dog sperm cryopreserved using Tris – egg yolk and Kenney diluents added with vitamin C and Trolox, the semen of four American Cocker, with age between 2 and 4 and proven fertility, were harvested. The semen was harvested through digital manipulation and the pool was divided into two aliquots diluted in Tris – egg yolk or Kenney. As following, the part referred to each diluent was divided and added with antioxidant substances, according to the experimental group: G1 = diluent (Control); G2 = diluent + 1200 μM of vitamin C; G3= diluent +200 μM of Trolox; G4= diluent + 1200 μM of vitamin C + 200 μM of Trolox. The samples were packaged in 0,25 mL straws in the concentration of 200×10^6 sperm cells, cryopreserved in freezing machine and stored in liquid nitrogen. After thawing, it was observed that the samples which were diluted in Tris – egg yolk added with vitamin C and Trolox (G4) were superior ($P < 0.05$) than those diluted with vitamin C (G2) or Trolox (G3), separately. Cells diluted in Tri – egg yolk added with vitamin C + Trolox (G4) had higher percentage of acrosomal integrity ($50,33 \pm 11,25$; $P < 0.05$) than the other experimental groups. The control group (G1) of the samples diluted in Kenney showed higher percentage ($P < 0.05$) of intact cells than those diluted in Tris – egg yolk. It was observed higher percentage of cells ($P < 0.05$) with head and tail showing the formation of formazana ++ on the samples added with Trolox (G3) and diluted with Tri – egg yolk than those diluted in Kenney. The finding of head and tail without formazan staining did not differ among the groups diluted in Tri – egg yolk and Kenney, but those which were diluted with Tris – egg

yolk had lower percentage ($P < 0.05$) on the group G2 (Trolox). It is concluded that the Kenney diluent is more effective on the preservation of the viability of dog sperm cells that were submitted to freezing, and that the addition of Vitamin C associated with Trolox, analogue of vitamin E, minimize the deleterious effects of the cryopreservation of semen on the sperm acrosomal integrity on the diluted samples in Tri – egg yolk.

Key Words: Diluent, vitamin C, Trolox, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

Procedimentos convencionais de criopreservação de sêmen causam extensivos danos químicos e físicos às membranas espermáticas, os quais são atribuídos a alterações na transição da fase lipídica e/ou aumento na peroxidação (ALVAREZ & STOREY, 1992), durante ou após a congelação, com conseqüente redução no vigor e na porcentagem de espermatozóides móveis (WATSON, 1995; ISACHENKO et al., 2004).

A membrana do acrossoma, derivada do aparelho de Golgi e formada durante a espermiogênese (CUNNINGHAM, 2004; KIERSZENBAUM, 2004), apresenta as maiores transformações nos espermatozóides, sendo responsável pela capacitação fisiológica (WATSON et al., 1992; SUKARDI et al., 1997; CROSS 1998) e, por conseguinte, requer proteção durante os procedimentos de congelação (WATSON, 1995).

Substâncias diluidoras são utilizadas com o objetivo de proteger as células espermáticas de efeitos deletérios do processo de congelação visando estabilizar a membrana plasmática, atuar como crioprotetores, fornecer nutrientes necessários ao metabolismo espermático e servir como tampão para manutenção do pH (JASKO, 1994).

Experimentos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a eficiência de diversos diluentes utilizados na criopreservação do sêmen de cão (OLAR et al., 1989; SILVA et al., 1997; SILVA et al., 2000). A maioria dos protocolos utiliza diluidores a base de gema de ovo, Tris, citrato de sódio (ANDERSEN, 1975; ENGLAND, 1993; SILVA et al., 2000) ou leite desnatado (KENNEY et al., 1975), acrescido de frutose (MOURA et al., 2002), glucose para refrigeração e congelação do sêmen de cão (PROVINCE et al., 1984; MOURA et al., 1999; MOURA et al., 2002). A gema de ovo possui lipoproteínas de alta e baixa densidade (BACILA, 2003) que protegem as células espermáticas de danos decorrentes do processamento de criopreservação (MOUSSA et al., 2002; MOURA et al., 2002).

Substâncias como albumina, encontrada na clara de ovo, têm sido utilizadas como agente protetor de membranas de espermatozóides em humanos (TWIGG et al., 1998; VISCONTI & KOPF, 1998). Glicerol e etilenoglicol são crioprotetores utilizados no sêmen de cão visando evitar danos causados aos espermatozóides durante a congelação, prevenindo ou reduzindo a formação de cristais de gelo, intra e extracelular que provocam danos aos componentes celulares (CAVALCANTI et al., 2002).

Estudos visam reduzir danos causados às células espermáticas decorrentes dos procedimentos de diluição, suplementação, armazenamento e variações de temperatura (DERIVAUX, 1980), incidência direta de luz, efeitos de concentração (PEÑA & LINDEFORSBERG, 2000), pH da amostra ou de substâncias adicionadas, tempo de manipulação das amostras (ROTH et al., 1998) e grau de estresse oxidativo relacionado ao metabolismo espermático (AITKEN, 1997; HEWITT & ENGLAND, 1998; HOLT, 2000; ELZANATY et al., 2002; KITAGAWA et al., 2004; ESKENAZI et al., 2005). Os antioxidantes naturais, como a carnitina (VICARI & CALOGERO, 2001) e as vitaminas C e E são utilizadas na dieta de homens (FRAGA et al., 1991; OMU et al., 1999; ESKENAZI et al., 2005), na suplementação do sêmen de garanhões (MARQUES et al., 2002) e na água de beber de ratos e coelhos (HSU et al., 1998; YOUSEF et al., 2003), com o propósito de proteger as células espermáticas contra danos causados pelo desequilíbrio entre a produção fisiológica de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante total nos ejaculados (AITKEN et al., 2004; GUERRA, 2005).

Objetivou-se com este trabalho estudar a viabilidade de espermatozóides de cães criopreservados utilizando os diluentes Tris-gema e Kenney adicionados com vitamina C e Trolox.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Utilizaram-se quatro cães da raça Cocker Americano pertencentes a canil privado, com idade variando entre 2 e 4 anos e fertilidade comprovada. Os animais foram mantidos em boxes individuais e alimentados com ração uma vez ao dia, e com acesso livre a água.

Colheita e análise de sêmen

O sêmen foi colhido através de manipulação digital, uma vez por semana, durante três semanas. O ejaculado foi colhido em cálice graduado e utilizou-se apenas a fração rica em

espermatozoides. O volume, a cor e viscosidade, foram macroscopicamente avaliados quanto a motilidade (percentual de espermatozoides móveis) e vigor espermático (*status* da motilidade espermática), com escore de 0 (sem movimento) a 5 (movimento progressivo rápido) foi avaliado em microscópio óptico, de acordo com o CBRA (1997).

A integridade do acrossoma espermático foi analisada através da técnica de Roth et al. (1998), modificada ao se utilizar 0,02 mg de lectina obtida de *Arachis hypogaea* marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) em 350 µL de PBS (Solução PNA). Colocaram-se 5µL da amostra em lâmina e, após secagem durante 5 minutos, armazenou-se em caixas fechadas a 4 °C, pelo período de 2 a 4 semanas. Para coloração, foram colocados 30µL da solução PNA no centro da lâmina preparada com a amostra de sêmen e homogeneizou-se até que a solução cobrisse grande área da lâmina. As lâminas foram colocadas na geladeira em caixas cobertas com papel alumínio durante 20 minutos. Após coloração, as lâminas foram mergulhadas em 50 mL de PBS (sem antibióticos) e secadas em caixas de isopor. A seguir, adicionaram-se 5µL da solução UCD (5 mg de Na azide em 0,5 mL de PBS + 5mg de p-fenilenediamina a 0,1 % + 4,5 mL de glicerol, pH 8,0) na lâmina, a qual foi coberta com lamínula. As lâminas foram avaliadas em microscópio fluorescente (filtro“MF”) com objetiva de 100X. Foram analisadas 200 células espermáticas classificadas como: a) acrossoma intacto quando a cabeça e/ou região apical apresentaram-se coradas em verde brilhante; b) acrossoma parcialmente reagido se a cabeça apresentou-se mesclada de verde fluorescente; c) acrossoma reagido quando a cabeça apresentou-se sem coloração verde ou foi observada apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça dos espermatozoides.

A integridade do DNA espermático foi analisada através da técnica de fluorescência Acridine Orange (AO), de acordo com Evenson et al. (1999). Após a colheita, diluíram-se 10 µL das amostras de sêmen em 1mL de solução Tris (0,01M), NaCl (0,15M) e EDTA (0,001M) com 7,4 de pH, em tubos de microcentrífuga, os quais foram transportados em nitrogênio líquido e mantidos a temperatura de -20 °C até análise. Após descongelação a 37 °C, 100µL da suspensão de espermatozoides foram colocadas em tubos de microcentrífuga, imersos em gelo e adicionaram-se 100µL de solução ácido-detergente (0,1% de Triton X-100, 0,08N de HCl e 0,15M de NaCl com pH 1,4). Trinta segundos após, foram adicionados 400µL de solução corante de AO (370mL de ácido cítrico monohidratado 0,1 M + 630µL de Na₂HPO₄ [dibásico] 0,2 M + 0,372g de EDTA [disódico] + 8,77g de NaCl, pH 6,0) e avaliadas 200 células utilizando filtro “MF” em microscópio de fluorescência, de acordo

com a seguinte interpretação: a) Células coradas em verde = DNA íntegro; b) Células coradas em laranja, ou vermelho = DNA danificado.

O grau de estresse oxidativo dos espermatozóides foi analisado utilizando-se o teste de coloração com Nitroblue Tetrazolium (NBT), de acordo com Esfandiari et al. (2003). Alíquotas de sêmen foram diluídas em NBT (10,0%), na proporção de 1:1 (v:v). Após incubação da suspensão em temperatura de 37 °C durante 30 minutos, a mesma foi mantida por período de 30 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 250g durante 5 minutos. Descartado o sobrenadante, o esfregaço foi preparado utilizando o pellet e submetendo à secagem em temperatura ambiente. A análise foi efetivada através da leitura de 200 células em microscópio de contraste de fase, sob imersão, de acordo com a presença ou ausência de formazana na cabeça ou cauda espermática: 1- formazana ocupando 50% ou menos da cabeça ou cauda (+); 2- formazana ocupando mais de 50% da cabeça ou cauda (++); 3 - ausência de formazana (-) na cabeça ou cauda.

A concentração espermática de cada amostra de sêmen foi determinada através da câmara de Neubauer. Somente foram utilizadas amostras que apresentaram concentração $\geq 200 \times 10^6$ espermatozóides/mL, motilidade espermática $\geq 80\%$ e vigor ≥ 3 .

Diluição do sêmen

Após análise, realizou-se um “Pool” do ejaculado dos animais, o qual foi dividido em duas alíquotas e diluídos com Tris-gema (3,28 g de Tris-hidroximetil-aminometano, 1,78 g de ácido cítrico monohidratado e 1,25 g de D-frutose, dissolvidos em 100 mL de água destilada + 20% de gema de ovo) ou Kenney (2,4 g de leite desnatado, 4,0 g de glucose, 0,75 mL de bicarbonato de sódio a 10%, 20 mg de gentamicina, dissolvidos em 100 mL de água bidestilada), modificado de Kenney (1975) pela adição de 20% de clara de ovo.

Cada alíquota referente ao diluidor Tris-gema ou Kenney, foi dividida em quatro porções iguais, acrescidas de diferentes concentrações de vitamina C ou Trolox e 7,0% de glicerol, constituindo os diferentes grupos experimentais: G1 = Diluente (Controle); G2 = Diluente + 1200 μ M de vitamina C; G3 = Diluente + 200 μ M de Trolox; G4 = Diluente + 1200 μ M de vitamina C + 200 μ M de Trolox.

Congelamento do sêmen

Após envase das amostras em palhetas de 0,25 mL, na concentração de 200×10^6 células espermáticas, realizou-se a congelamento em máquina utilizando a curva de $0,25^\circ\text{C}/\text{minuto}$ até 5°C , de $20^\circ\text{C}/\text{minuto}$ até -5°C , assim como de $20^\circ\text{C}/\text{minuto}$ até -120°C . A seguir, as palhetas foram imersas e armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C . Uma semana após, as amostras foram descongeladas a temperatura de 37°C durante 60 segundos e diluídas em Tris (1:1; v:v) antes de serem analisadas quanto a motilidade, vigor, integridade do acrossoma e do DNA, e grau de estresse oxidativo.

Análise estatística

Para a análise dos dados, foram obtidas as medidas estatísticas: média e desvio padrão e utilizados os testes t-Student com variâncias iguais ou desiguais e o teste F (ANOVA) e no caso de diferenças significante entre os grupos, foram utilizados testes de comparações pareadas de Tukey. A verificação da hipótese de igualdade entre variâncias foi realizada através do teste F, para a finalidade específica. Os dados foram digitados na planilha Excel. O software utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SAS (Statistical Analysis System-versão 8). A margem de erro, utilizada na decisão dos testes estatísticos, foi de 5,0%.

RESULTADOS

As frações ricas em espermatozoides apresentaram volume médio de 1,04 mL, com concentração espermática média de $381,6 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Antes da congelamento, as células apresentaram valores de motilidade e vigor de, respectivamente, $83,33 \pm 2,89\%$ e $4,33 \pm 0,58$.

Após descongelamento (Tabela 1), observou-se que amostras diluídas em Tris-gema, quando suplementadas com Vitamina C e Trolox (G4) não diferiram do grupo controle (G1), mas foram superiores ($P < 0,05$) àquelas diluídas com vitamina C (G2) ou Trolox (G3), separadamente. Todavia, amostras diluídas em Kenney não demonstraram diferença significativa entre os grupos controle e os suplementados com vitamina C ou Trolox. Foi observado que, o vigor apresentado pelas amostras de sêmen, não diferiu entre os diluentes (Tris-gema ou Kenney) suplementados com vitamina C ou Trolox, sendo considerado bom para amostras criopreservadas de sêmen de cão.

Na avaliação do acrossoma espermático antes da congelação constatou-se que $84,50 \pm 4,27\%$ de células apresentaram acrossoma íntegro. Após a descongelação (Tabela 2; Figura 1a), células diluídas em Tris-gema suplementadas com vitamina C + Trolox (G4), apresentaram maior percentual de integridade ($50,33 \pm 11,25$) do que os demais grupos experimentais, com percentuais de integridade de $16,00 \pm 11,69$ (G1), $20,50 \pm 16,53$ (G2) e $39,67 \pm 1,76$ (G3). Nos grupos em que se utilizou o diluente Kenney não se observou diferença entre os grupos controle e os demais grupos suplementados com vitamina C (G2), Trolox (G3) ou vitamina C + Trolox (G4). Todavia, ao se comparar o efeito dos diluentes (Tris-gema ou Kenney), em cada grupo suplementado com antioxidantes, constatou-se que o grupo controle (G1) de amostras diluídas em Kenney apresentaram maior percentual ($P < 0,05$) de células íntegras do que aquelas diluídas em Tris-gema.

Após avaliação do DNA através do teste Acridine Orange constatou-se que 100,00% das células espermáticas, antes ou depois da congelação, encontravam-se coradas de verde fluorescente (Figura 1b), demonstrando não haver danos na estrutura do DNA nuclear, em todos os grupos experimentais, independente de diluente (Tris-gema ou Kenney) ou suplementação com substâncias antioxidantes.

Tabela 1 – Porcentual de motilidade e vigor espermático de amostras de sêmen de cães da raça Cocker Americano submetidas a congelação utilizando vitamina C e Trolox nos diluentes Tris-gema ou Kenney

Grupos Experimentais	Motilidade (%)		Vigor (0-5)	
	Tris-gema Média ± dp	Kenney Média ± dp	Tris-gema Média ± dp	Kenney Média ± dp
G1	$66,67 \pm 6,77^a$	$76,67 \pm 5,77$	$4,00 \pm 0,00$	$4,33 \pm 0,58$
G2	$50,00 \pm 0,00^b$	$63,33 \pm 15,28$	$3,67 \pm 0,58$	$4,00 \pm 1,00$
G3	$50,00 \pm 0,00^b$	$63,33 \pm 11,55$	$4,00 \pm 0,00$	$3,67 \pm 0,58$
G4	$66,67 \pm 11,55^a$	$66,67 \pm 5,67$	$3,67 \pm 0,58$	$3,67 \pm 0,58$

dp= desvio padrão; G1= Diluente (Controle); G2= Diluente + 1200µM de vitamina C; G3= Diluente + 200 µM de Trolox; G4= Diluente + 1200µM de vitamina C + 200µM de Trolox; Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam $P < 0,05$.

Tabela 2 – Porcentual de espermatozóides de cães da raça Cocker Americano com acrossomas intactos após congelação utilizando vitamina C e Trolox nos diluentes Tris-gema ou Kenney

Grupos Experimentais	Acrossomas íntegros (%)	
	Tris-gema Media ± dp	Kenney Media ± dp
G1	16,00 ± 11,69 ^{bB}	64,33 ± 7,82 ^A
G2	20,50 ± 16,53 ^{ab}	33,50 ± 4,92
G3	39,67 ± 1,76 ^{ab}	53,33 ± 25,25
G4	50,33 ± 11,25 ^a	50,67 ± 20,57

dp= desvio padrão; G1= Sem antioxidante (Controle); G2= Diluente + 1200µM de vitamina C; G3= Diluente + 200 µM de Trolox; G4= Diluente + 1200µM de vitamina C + 200µM de Trolox; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam P<0,05; Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam P<0,05.

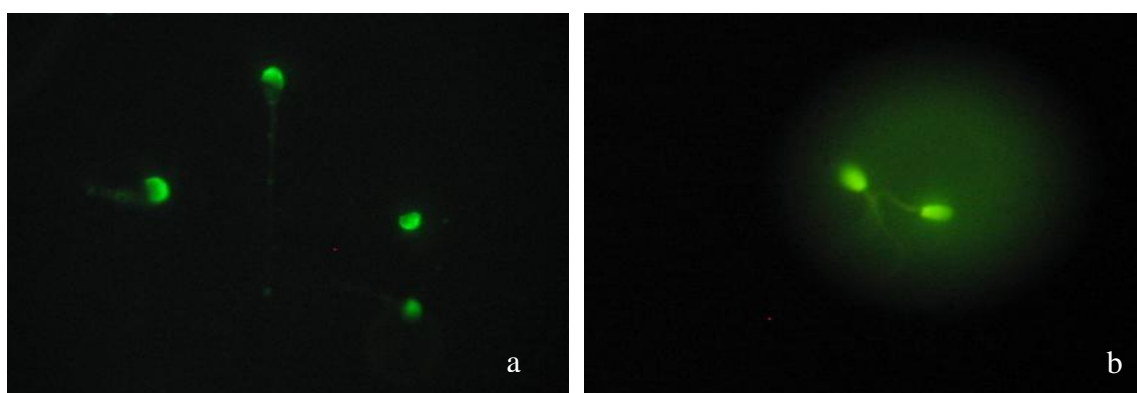


Figura 1 - Espermatozóides de cão da raça Cocker Americano com acrossoma (a) e DNA (b) íntegros após congelação em diluidor Kenney.

A análise do grau de estresse oxidativo foi observada através da formação de formazana na cabeça ou em toda a extensão da cauda dos espermatozóides, desde sua inserção até a peça principal, de forma contínua ou intermitente (Tabela 3; Figura 2). Observou-se maior porcentual de células (P<0,05) com cabeça e cauda apresentando formação de formazana (++) nas amostras suplementadas com Trolox (G3) e diluídas com Tris-gema quando comparada àquelas diluídas em Kenney. A constatação de cabeça e cauda sem coloração com formazana não diferiu entre os grupos diluídos em Tris-gema e Kenney, mas aqueles diluídos com Tris-gema apresentaram diferença entre os grupos (P<0,05) suplementados com antioxidantes, sendo constatado menor porcentual no grupo G2 (Trolox).



Figura 2 - Espermatozoides de cão da raça Cocker Americano sem coloração de formazana na cabeça (*) e com depósito de formazana na cauda (**) após congelamento em diluidor Kenney.

Tabela 3 – Porcentual de espermatozoides de cães da raça Cocker Americano com diferentes graus de estresse oxidativo avaliado através de formação de formazana, após congelamento utilizando Tris-gema ou Kenney suplementados com vitamina C e Trolox

Variável	Diluidor	Grupos experimentais			
		G1 Média ± DP	G2 Média ± DP	G3 Média ± DP	G4 Média ± DP
Cabeça e cauda Formazana ++	Tris-gema	5,83±0,29	3,17±2,75	3,83±1,76 ^a	2,17±1,53
	Kenney	2,17±0,29	2,33±1,89	0,50±0,50 ^b	3,33±2,08
Cabeça e cauda Formazana -	Tris-gema	85,33±1,15 ^{AB}	82,17±2,47 ^B	88,33±1,04 ^{AB}	93,17±6,03 ^A
	Kenney	84,17±14,18	79,17±9,54	88,67±3,01	83,17±11,81
Cabeça Formazana ++	Tris-gema	5,50±0,50 ^A	2,83±0,76 ^{AB}	4,00±1,73 ^A	1,17±0,76 ^{BB}
	Kenney	2,83±1,61	2,00±2,29	4,00±2,50	4,00±0,87 ^a
Cabeça Formazana -	Tris-gema	80,17±0,58 ^B	83,00±2,78 ^B	86,00±1,80 ^{AB}	91,33±4,04 ^A
	Kenney	83,83±12,77	80,67±9,31	85,00±2,00	81,83±7,91
Peça intermediária formazana ++	Tris-gema	6,33±0,76	9,67±6,35	4,67±0,76	4,17±4,54
	Kenney	8,67±6,03	12,33±7,09	6,17±0,58	8,83±5,84
Peça intermediária Formazana +	Tris-gema	2,50±00,00	5,00±3,61	3,17±1,15	0,50±0,87
	Kenney	5,00±8,66	6,17±5,06	4,67±2,75	4,67±4,16

dp= desvio padrão; G1= Diluente (Controle); G2= Diluente + 1200µM de vitamina C; G3= Diluente + 200 µM de Trolox; G4= Diluente + 1200µM de vitamina C + 200µM de Trolox. ; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam P<0,05; Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam P<0,05.

Nos espermatozoides que apresentaram cabeça com formazana (++), constatou-se diferença entre os diluentes Tris-gema e Kenney apenas quando os mesmos foram suplementados com vitamina C + Trolox (G4). Entretanto, ao se analisar as amostras, de acordo com cada diluente isoladamente, observou-se menor porcentual de cabeças com estresse oxidativo ($P < 0,05$) nas amostras diluídas em Tris-gema com adição de vitamina C + Trolox (G4). Ao se observar cabeça sem formação de formazana, pode-se comprovar que não houve diferença entre aquelas diluídas em Tris-gema ou Kenney, mas constatou-se maior porcentual de células pertencentes ao grupo G4 (vitamina C + Trolox) sem estresse oxidativo na cabeça. Ao se avaliar espermatozoides com peça intermediária corada com formazana (+ e ++), não se observou diferença significativa entre diluentes, assim como entre os grupos suplementados com antioxidantes.

DISCUSSÃO

Após a criopreservação apenas uma porção de espermatozoides permanece viva (WATSON, 1995), uma vez que subpopulações de células podem sofrer danos letais (WATSON, 2000), relacionados ao metabolismo aeróbico resultante da elevada produção de ROS que podem danificar DNA, lipídios, proteínas e carboidratos (SIES, 1993), ou a manipulação, diluição e criopreservação do sêmen (DERIVAUX, 1980; ROTH et al., 1998; PEÑA & LINDE-FORSBERG, 2000).

A diluição de espermatozoides mamíferos com pequenos volumes de solução salina ou outras soluções isotônicas é responsável pela ativação da motilidade. Entretanto, extensas diluições determinam perda irreversível da motilidade, da atividade metabólica e da capacidade fertilizante *in vivo*, conhecida como efeito diluição (MANN, 1964). O mecanismo de inativação espermática causada pela diluição excessiva se assemelha àquela observada na senescência de espermatozoides durante o armazenamento, como resultado do choque térmico ou de outros tratamentos que desestabilizem as membranas espermáticas (GILLAN & MAXWELL, 1999).

Além do efeito osmótico, acredita-se que a diluição do sêmen também reduz proteínas, antioxidantes naturais e outros componentes benéficos do plasma seminal necessários para manutenção da integridade da membrana e função espermática. Além disso, a redução destes componentes pode criar cargas energéticas entre espermatozoides, resultando em aglutinação cabeça-a-cabeça, um problema que pode ser minimizado através

da adição de pequenas quantidades de proteínas ao meio, como albumina do soro bovino, ou de plasma seminal (MAXWELL & JOHNSON, 1997).

Durante o processo de criopreservação observa-se redução irreversível na motilidade, na integridade morfológica e na capacidade fertilizante de uma subpopulação de espermatozóides, os quais podem ser resultantes do acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo celular ou, principalmente, pelo aumento na produção de ROS (WANG et al., 1997; BALL et al., 2001; BAUMBER et al., 2003).

Proteção contra a elevada concentração de ROS e prevenção de danos celulares através da capacidade antioxidante total encontrada nos espermatozóides ou no plasma seminal, são de grande importância para a fisiologia da reprodução (LEWIS et al., 1997; OCHSENDORF et al., 1998; YEUNG et al., 1998). O plasma seminal não é a única fonte de antioxidante extracelular do sistema reprodutor masculino (IRVINE, 1996). No epidídimo, a relativa deficiência de enzimas antioxidantes intracelulares e a elevada concentração de ácidos graxos insaturados na membrana dos espermatozóides, faz com que os mesmos sejam extremamente vulneráveis a estresse oxidativo (GIL-GUZMAN et al., 2001). No entanto, ao atingirem a cauda do epidídimo, esses gametas encontram microambiente repleto de substâncias antioxidantes (Glutathione sintetase, GPx5, PH-GPx ou GPx4, Tioredoxina peroxidase, CuZn-SOD e Glutathione S-transferase) que reduzem a concentração de ROS (JERVIS & ROBAIRE, 2001; ELZANATY et al., 2002).

Durante a ejaculação, a secreção das glândulas sexuais acessórias adiciona algumas defesas antioxidantes ao sêmen, como a Superóxido dismutase, Catalase (ZINI et al., 2002), Glutathione peroxidase (YEUNG et al., 1998), vitaminas C e E, hipotaurina, taurina e albumina (LEWIS et al., 1997; YEUNG et al., 1998), cuja concentração e origem dependem da espécie. Entretanto, durante o procedimento de criopreservação, o plasma seminal, considerado fonte de proteção antioxidante dos espermatozóides, é removido ou diluído através da adição de substâncias com capacidade de manter o pH, aumentar o volume do ejaculado e proteger contra choque térmico (JASKO, 1994).

O ácido ascórbico é conhecido por atuar como agente inibidor de grande variedade de ROS (SIES et al., 1992), enquanto a vitamina E (α -tocoferol e seus derivados) é considerado o inibidor primário de espécies reativas encontradas em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos e no plasma seminal (SIKKA, 2004). Neste experimento, constatou-se que amostras diluídas em Tris-gema, quando adicionadas de vitamina C (G2) ou Trolox (G3) isoladamente, devem ter inibido a fisiologia espermática, uma vez que apresentaram redução do percentual de células móveis. Fato que pode ser

explicado pelas concentrações de vitamina C e Trolox utilizadas, uma vez que trabalho desenvolvido anteriormente (dados não publicados) constatou que adição de vitamina C e Trolox, nas mesmas concentrações utilizadas neste experimento, foi considerada elevada ou reduzida, respectivamente, determinando inibição da fisiologia espermática de cães, apesar de apresentarem valores superiores aos 30% recomendados por Concannon & Battista (1989) para serem utilizadas na inseminação artificial (SILVA & VERSTEGEN, 1995; SILVA et al., 1996).

Os valores de motilidade espermática, encontrados em amostras de sêmen de cão diluídas em Tris-gema, com vitamina C ou Trolox, foram semelhantes aos observados por Moura et al. (1999, 2002) utilizando este diluente sem adição de antioxidantes. Entretanto, foram superiores aos relatados por Cavalcanti et al. (2002), ao utilizarem Tris-gema acrescida de glicerol a 7% (31,20%) ou etilenoglicol a 4 (19,00%) e 7% (13,53%).

Todavia, a adição de vitamina C ou Trolox, isolados ou em conjunto, ao meio diluidor Kenney não determinou nenhuma alteração na motilidade espermática, mas foram maiores do que aquele relatado por Moura et al. (1999, 2002), sem adição de antioxidantes. Estes achados podem ser explicados pela adição de ovoalbumina a este diluidor, uma vez que esta proteína é considerada um antioxidante efetivo devido à sua afinidade por anions ou como reguladora da pressão osmótica no transporte de ácidos graxos (TWIGG et al., 1998; VISCONTI & KOPF, 1998). Entretanto, a associação de vitamina C e Trolox (G4) ao meio diluidor Tris-gema ou Kenney parece não ter determinado nenhum efeito sobre a motilidade das células, uma vez que não se constatou diferença entre estes grupos e o controle. Estes resultados podem ser decorrentes da adição inadequada dos antioxidantes ou da produção de agente oxidante diferente do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), divergindo de Buettner (1993) ao relatar que a vitamina C atua sinergicamente com a vitamina E através da geração de tocoferol a partir de radicais tocoferoxil, produto da interação de tocoferol e radical livre de oxigênio. Estas vitaminas agem prevenindo a peroxidação lipídica, reduzindo a produção de ROS induzida por H_2O_2 e protegendo os espermatozoides contra danos de DNA (DONNELLY et al., 1999).

As médias de motilidade e vigor, encontrados nos grupos diluídos com Tris-gema ou Kenney foram acima dos valores recomendados para doses de sêmen congeladas (CONCANNON & BATTISTA, 1989; SILVA & VERSTEGEN, 1995; SILVA et al., 1996), evidenciando que, independentemente da adição de antioxidantes, estes diluentes, foram eficientes na preservação de danos espermáticos em amostras de sêmen congeladas de cães. Fato que pode ser explicado pela adição de gema de ovo ou de ovoalbumina

contidas na clara, ou pelo controle de temperatura realizado na máquina de congelamento. Os resultados observados também podem ser decorrentes do tempo de descongelamento das amostras, que se mostrou mais efetivo a 37°C durante 60 segundos, quando comparados a outros resultados obtidos em experimentos realizados em nosso laboratório.

A análise de integridade de acrossoma através da técnica de FITC-PNA demonstrou que espermatozoides de cão coraram-se apenas na região acrossomal da célula, corroborando com Roth et al. (1998), ao utilizarem este corante no sêmen de antílope. Neste experimento, constatou-se que as amostras de sêmen diluídas em Kenney apresentaram de maneira geral desempenho mais satisfatório do que aquelas em que se utilizou Tris-gema. Todavia, observou-se que os espermatozoides diluídos tanto em Tris-gema quanto em Kenney, apresentaram grandes percentuais de células com acrossoma parcialmente reagidos, que segundo Roth et al. (1998), está relacionado ao início do processo de reação acrossômica que ocorre durante a preparação da lâmina. Ao se avaliar a integridade de acrossoma em amostras diluídas em Tris-gema, observou-se maior porcentagem de células íntegras ao se adicionar vitamina C + Trolox (G4), sinalizando haver ocorrido sinergismo entre estas substâncias antioxidantes, potencializando a ação do análogo da vitamina E (Trolox), considerado o inibidor primário de radicais livres encontrados em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos (SIKKA, 2004). Todavia, constata-se que a adição de substâncias antioxidantes não aumentou a integridade células diluídas em Kenney, enquanto o grupo controle mostrou ser superior àquele diluído em Tris-gema, evidenciando que a integridade do acrossoma das células espermáticas é maior em amostras diluídas Kenney (a base de leite desnatado) acrescido de albumina do que em Tris-gema, que necessitou da adição de vitamina C e Trolox para preservar a integridade do acrossoma dos espermatozoides.

De acordo com as recomendações de Concannon e Battista (1989) e com os resultados de integridade do acrossoma, as amostras de sêmen diluídas em Tris-gema suplementadas com Trolox (G3) ou vitamina C + Trolox (G4), e aquelas diluídas em Kenney, com ou sem antioxidantes, poderiam ser utilizadas para inseminação de cadelas, por apresentarem valores maiores que 30%.

A adição de ácido ascórbico e α -tocoferol em diluentes de sêmen humano, fornece significativa proteção a danos de DNA espermático (HUGHES et al., 1998). O ácido ascórbico inibe radicais hidroxil hidrossolúveis encontrados em maior concentração no plasma seminal (SIES et al., 1992). A vitamina E (α -tocoferol e seus derivados) protege as células do estresse oxidativo (KAGAN et al., 1992) e de danos da membrana e do DNA (SIKKA, 2004). Segundo Hughes et al. (1998), as vitaminas C e E quando utilizadas

separadamente como suplementação espermática promovem proteção contra danos de DNA, mas quando adicionadas juntas determinam efeitos negativos a estas células.

Apesar de não haver sido mensurada a concentração de ROS em amostras criopreservadas de sêmen de cão, utilizando os diluentes Tris-gema ou Kenney, suplementados com vitamina C ou Trolox, acredita-se que a formação de agente oxidante foi insuficiente para determinar danos ao material genético do núcleo celular, uma vez que não foram constatados danos ao DNA de nenhuma amostra de sêmen, justificando as afirmações de que o estresse oxidativo que induz dano no DNA está associado a sêmen de baixa qualidade em homens com histórico de subfertilidade (AITKEN & KRAUSZ, 2001; CHOHAN et al., 2003; MOUSTAFA et al., 2004), diferindo dos cães utilizados neste experimento, que apresentavam boa qualidade seminal. Vale ressaltar que nenhum procedimento de lavagem ou de centrifugação foi realizado no sêmen utilizado neste experimento que aumentasse a produção de ROS (TWIGG et al., 1998).

Neste experimento, constatou-se que amostras diluídas em Kenney não apresentaram diferença entre os grupos suplementados com antioxidantes e o controle quanto ao porcentual de células sem estresse oxidativo, classificadas como cabeça e cauda sem coloração com formazana, evidenciando que este diluidor determinou menor grau de estresse oxidativo às células espermáticas. Entretanto, ao se utilizar o diluente Tris-gema, constatou-se que a associação de vitamina C e Trolox foi superior à adição de vitamina C, apesar de não diferirem do grupo controle, discordando dos relatos de Rolf et al. (1999). Todavia estes autores adicionaram essas vitaminas (C e E) à dieta de homens portadores de astenozoospermia ou oligozoospermia moderada e não observaram melhora nos parâmetros seminais.

Deve-se ressaltar que em todas as classificações de formação de formazana na célula espermática, constatou-se maiores porcentuais de células classificadas como cabeça e cauda negativas e cabeças negativas, evidenciando que o grau de estresse oxidativo das células espermáticas de cães submetidas a congelação, foi menor, do que aquele observado no sêmen humano portador de subfertilidade, evidenciando nível satisfatório de maturação de células espermáticas (MOUSTAFA et al., 2004) colhidas dos cães ou que os diluentes Tris-gema e Kenney acrescido de ovoalbumina, sozinhos ou suplementados com antioxidantes (vitamina C e Trolox), podem ter se ligado a componentes de membrana ou ter funcionado como acceptor de anions, respectivamente, protegendo as células durante a criopreservação (KAGAN et al., 1992).

Por conseguinte, baseado nos dados de motilidade e integridade do acrossoma, conclui-se que o diluente Kenney é mais efetivo na preservação da viabilidade das células espermáticas de cão submetidas a congelamento e que a suplementação da vitamina C associada a Trolox, análogo hidrossolúvel da vitamina E, minimiza os efeitos deletérios da criopreservação do sêmen sobre a integridade do acrossoma espermático de amostras diluídas em Tris-gema.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 3, n. 3, p. 169-173, 1997.
- AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, p. 497-506, 2001.
- AITKEN, R.J.; RYAN, A. L.; BAKER, M A. et al. A Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 36, n. 8, p. 994-1010, 2004.
- 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. **J. Androl.**, v. 13, p. 232-241, 1992.
- ANDERSEN, K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. **Zuchthygiene**, v. 10, p. 1-4, 1975.
- BACILA, M. **Bioquímica Veterinária**, 2^a. Ed., Robe Editorial, São Paulo, 2003, 583p.
- BALL, B.B.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, p. 508-515, 2001.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **J. Androl.**, v. 24, p. 621-628, 2003.
- BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants, lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 300, p. 535-543, 1993.
- CAVALCANTI, M.C.O.; MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P. et al. Ação crioprotetora do glicerol e etilenoglicol no congelamento de sêmen de cão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 26, p. 174-176, 2002.

- CHOHAN, K.R.; GRIFFIN, J.; CARRELL, D.T. Assessment of DNA damage to sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. In: ANNUAL MEETING OF THE ESHE, 19, 2003, Madrid. **Proceedings...** Madrid, ESHE 2003. CD-ROOM.
- CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. **Canine semen freezing and artificial insemination.** In: KIRK, R.W. (ed), Current Veterinary Therapy X. Philadelphia: WB Saunders Company, p. 1247-1258, 1989.
- CROSS, N. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 7-11, 1998.
- CUNNINGHAM, J.G. **Gestação e parto.** In: Tratado de Fisiologia Veterinária. Editora Guanabara Koogan, 3^a. Ed., Rio de Janeiro, 2004, 579p.
- DERIVAUX, J. **Reprodução dos Animais Domésticos.** O Macho-Inseminação Artificial. Editorial Acribia, Zaragoza, 1980, 446 p.
- 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, p. 505-511, 1999.
- ELZANATY, S.; RICHTHOFF, J.; MALM, J. et al. The impact of epididimal and accessory gland function on sperm motility. **Hum. Reprod.**, v. 17, p. 2904-2911, 2002.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: Review. **J. Reprod. Fertil.**, v. 47 (suppl), p. 243-255, 1993.
- ESFANDIARI, N.; SHARMA R.K.; SALEH R.A. et al. Utility of the Nitroblue Tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leucocytes and spermatozoa. **J. Androl.**, v. 24, n. 6, p. 862-870, 2003.
- ESKENAZI, B.; KIDD, S.A.; MARKS, AR. et al. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. **Hum. Reprod.**, v. 20, n. 4, p.1006-1012, 2005.
- EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Hum. Reprod.**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999
- FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p.11003-11006, 1991.
- GIL-GUZMAN, E.; OLLERO, M.; LOPEZ, M.C. et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Hum. Reprod.**, v. 16, p. 1922-1930, 2001.

- GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.C. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl 54, p. 271-283, 1999.
- GUERRA, M.M.P. Importância dos oxidantes na fisiologia espermática. In: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 2005, Teresina. **Proceedings...** Teresina, 2005. CDROOM.
- HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 51, p. 321-332, 1998.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.
- HSU, P.; LIU, M.; HSU, C. et al. Effects of vitamin E and /or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology**, v. 128, p. 169-179, 1998.
- HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; MCKELVEY, V.J. et al. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Hum. Reprod.**, v. 13, p. 1240-1247, 1998.
- IRVINE, D.S. Glutathione as a treatment for male infertility. **Rev. Reprod.**, v. 1, p. 6-12, 1996.
- ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; KATKOV, I.I. et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. **Hum. Reprod.**, v. 19, n. 4, p. 932-939, 2004.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Vet.**, v. 10, p. 156-165, 1994.
- JERVIS, K.M.; ROBAIRE, B. Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 696-703, 2001.
- KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; FORTE, T. et al. Recycling of vitamin E in low density lipoproteins. **J. Lipid. Res.**, v. 33, p. 385-397, 1992.
- KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 21, 1975, Boston. **Proceedings ...**, Boston, 1975. p. 327-36.
- KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular. Uma introdução à patologia.** Elsevier Editora Ltda., São Paulo, 2004, 654 p.
- KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A. et al. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species

(ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v. 62, p. 1186-1197, 2004.

LEWIS, S.E.M.; STERLING, E.S.L.; YOUNG, I.S. et al. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in infertile men. **Fertil. Steril.**, v. 67, n. 1, p. 142-147, 1997.

MANN, T. **The biochemistry of semen and of the male reproductive tract**. London: Methuen and Co., 1964, 493 p.

MARQUES A.; ARRUDA R.P.; CELEGHINI E.C.C. et al. Effects of ascorbic acid and pentoxifyline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 46, p. 408-418, 1997.

MOURA, C.S.; CAVALCANTI, M.C.O.; GUERRA, M. M .P. et al. Criopreservação do sêmen canino utilizando diferentes métodos de refrigeração. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, p. 304-306, 1999.

MOURA, C. S., CAVALCANTI, M.C.O, GUERRA, M.M.P. et al. Teste de avaliação *in vitro* e criopreservação do sêmen de cão utilizando diferentes diluidores. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v. 9, p. 102-106, 2002.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. 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. et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. **Hum. Reprod.**, v. 19, p. 129-138, 2004.

OCHSENDORF, F.R.; BUHL, R.; BASTLEIN, A. et al. Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. **Hum. Reprod.**, v. 13, p. 353-359, 1998.

OLAR, T.T.; BOWEN, R. A.; PICKETT, B. W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures of postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v. 31, p. 451-461, 1989.

OMU A.E.; FATINIKUN T.; MANNAZHATH N. et al. Significance of simultaneous determination of serum and seminal plasma α -tocopherol and retinol in infertile men by high-performance liquid chromatography. **Andrologia**, v. 31, p. 347-354, 1999.

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoal concentration and pos-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 703-718, 2000.

PROVINCE, A. C.; AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. et al. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5 °C. **Theriogenology**, v. 4, p. 409-415, 1984.

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

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

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A.R. Antioxidant function of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 669, p. 7-20, 1992.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense (Review). **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-219, 1993.

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

SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 44, p. 571-579, 1995.

SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **Vet. Rec.**, v. 138, p. 154-157, 1996.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SOUZA, D. M. B. et al. Comparação entre os diluentes à base de água de côco e à base de Tris na criopreservação de sêmen canino. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 2, Fortaleza, 1997. **Anais...**, Fortaleza, 1997.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de côco. **Ciênc. Rural**, v. 30, p. 1021-1025, 2000.

SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 46, p. 89-96, 1997.

- .TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E. 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. **Hum. Reprod.**, v. 13, p. 1429-1436, 1998.
- VICARI, E.; CALOGERO, A.E. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostato-vesiculo-epididymitis. **Hum. Reprod.**, v. 16, p. 2338-2342, 2001.
- VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 1-6, 1998.
- WANG, A.W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I. et al. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, p. 921-925, 1997.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- YEUNG, C.H.; COOPER, T.G.; DE GEYTER, M. et al. Studies on the origin of redox enzymes in seminal plasma and their relationship with results of in-vitro fertilization. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 4, p. 835-839, 1998.
- YOUSSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 76, p. 99-111, 2003.
- ZINI, A.; FISHER, M.A.; MAK, V. et al. Catalase-like and superoxide dismutase-like activities in human seminal plasma. **Urol. Res.**, v. 30, p. 321-323, 2002.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R.A.; SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Hum. Reprod. Update**, v. 9, p. 1-15, 2003.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urol. Clin. North Am.**, v. 29, p. 817-827, 2002.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil. Steril.**, v. 4, p. 829-843, 2003.
- AITKEN, R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 3, n. 3, p. 169-173, 1997.
- AITKEN, R.J. The amoroso lecture. The human spermatozoa- a cell in crisis. **J. Reprod. Fertil.**, v. 115, p. 1-7, 1999.
- AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 16, p. 581-588, 2004.
- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 97, p. 441-450, 1993.
- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Analysis of the extent to which sperm movement can predict the results of ionophore-enhanced functional assay of the acrosome reaction and sperm-oocyte fusion. **Hum. Reprod.**, v. 9, p. 1867-1874, 1994.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 81, p. 459-469, 1987.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biol. Reprod.**, v. 40, p. 183-197, 1989.
- AITKEN, R.J.; KRAUSZ C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, p. 497-506, 2001.
- AITKEN, R.J.; VERNET, P. Maturation of redox regulation mechanisms in the epididymis. **J. Reprod. Fertil. (Suppl S3)**, p. 109-118, 1998.
- AITKEN, R.J.; IRVINE, D.S.; WU, F.C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **Am. J. Obst. Gyn.**, v. 164, p. 542-551, 1991.

AITKEN, R.J.; PATERSON, M.; FISHER, H. et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **J. Cell Sci.**, v. 180, p. 2017-2025, 1995.

AITKEN, R.J.; GORDON, E.; HARKISS, D. et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 1037-1046, 1998.

AITKEN, R.J.; RYAN, A.L.; CURRY, B.J. et al. Multiple forms of redox activity in populations of human spermatozoa. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 9, n. 11, p. 645-661, 2003.

AITKEN, R.J.; RYAN, A. L.; BAKER, M A. et al. A Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Rad. Biol. Méd.**, v. 36, n. 8, p. 994-1010, 2004.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. et al. **Biologia Molecular da Célula**. Artes Médicas, 3^a ed., Porto Alegre, Rio Grande do Sul, pp. 1026-1034, 1997.

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

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. **J. Androl.**, v. 13, p. 232-241, 1992.

ANDERSEN, K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. **Zuchthygiene**, v. 10, p. 1-4, 1975.

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M. et al. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 354-360, 2002.

ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W. et al. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 26, n. 7/8, p. 869-880, 1999.

ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.J. et al. Antioxidant potential of human serum albumin: role in the recovery of high quality human spermatozoa for assisted reproductive technology. **J. Androl.**, v. 19, n. 4, p. 412-419, 1998.

ASHWORTH, P.J.C.; HARRISON, R.A.; MILLER, N.G.A. et al. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 6, p. 173-180, 1994.

- AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H. et al. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 185-192, 1997.
- AZIZ, N.; SALEH, R.A.; SHARMA, R.K. et al. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. **Fertil. Steril.**, v. 2, n. 81, p. 349-354, 2004.
- BACILA, M. **Bioquímica Veterinária**, 2^a. Ed., Robe Editorial, São Paulo, 2003, 583p.
- BAEHNER, R.L.; BOXER, L.A.; DAVIS, J. The biochemical basis of nitroblue tetrazolium reduction in normal human and chronic granulomatous disease polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v. 48, p. 309-313, 1976.
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J-F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.**, v. 21, p. 1-7, 2000.
- BAILEY, J.L.; ROBERTSON, L.; BUHR, M.M. Calcium regulation, computerized motility parameters and the fertility of bovine spermatozoa. **Can J. Anim Sci.**, v. 74, p. 53-58, 1994.
- BALL, B.B.; VO, A.T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. **J. Androl.**, v. 23, p. 259-269, 2002.
- BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, p. 508-515, 2001.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **J. Androl.**, v. 24, n. 4, 2003.
- BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A. et al. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 60, p. 1239-1247, 2003.
- BECONI, M.T.; FRANCA, C.R.; MORA, N.G. et al. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p. 841-851, 1993.
- BENCHAIB, M.; BRAUN, V.; LORNAGE, J. et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. **Hum. Reprod.**, v. 18, n. 5, p. 1023-1028, 2003.
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C. et al. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-286, 2001.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 55, p. 282-288, 2000.

BRENER E.; RUBINSTEIN S.; COHEN G. et al. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. **Biol. Reprod.**, v. 68, p. 837-845, 2003.

BRÈQUE, C.; SURAI, P.; BRILLARD, J. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 66, p. 314-323, 2003.

BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants, lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 300, p. 535-543, 1993.

CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A. et al. Oxidative effect of nitric oxide and male infertility. **J. Bras. Pat. Méd. Lab.**, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2002.

CAVALCANTI, M.C.O.; MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P. et al. Ação crioprotetora do glicerol e etilenoglicol no congelamento de sêmen de cão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 26, p. 174-176, 2002.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F. et al. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v. 121, p. 395-401, 2001.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. **Mol., Reprod. Dev.**, v. 59, p. 451-458, 2001.

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

CHEN, H.; CHOW, P.H.; CHENG, S.K. et al. Male genital tract antioxidant enzymes: Their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. **J. Androl.**, v. 24, p. 704-711, 2003.

CHOHAN, K.R.; GRIFFIN, J.; CARRELL, D.T. Assessment of DNA damage to sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. In: ANNUAL MEETING OF THE ESHE, 19, 2003, Madrid. **Proceedings ...**, CD-ROOM, 2003.

COLETO, Z.F. **Eficiência de diferentes métodos de avaliação da viabilidade de espermatozoides de reprodutores das raças holandesa, nelore e parda alpina submetidos a criopreservação.** Recife, PE, 2000, 49p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco.

COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; PAES BARRETO, M.B. et al. Fluorescence technique to evaluate the integrity of the membrane of cryopreserved spermatozoa. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 21, Punta del Este, Uruguay, **Proceedings...**, CD-ROOM, 2000a.

COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; WISCHRAL, A. et al. Thecniques of sperm evaluation in thawed doses of Holstein bovines. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 21, Punta del Este, Uruguay, **Proceedings...**, CD-ROOM, 2000b.

COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; SOUZA, D.M.B. et al. Comparação da eficiência de técnicas de avaliação de espermatozóides caprinos criopreservados. **Ciênc. Vet. Tróp.**, v. 4, p. 221-228, 2001.

CONCANNON, P.W.; BATTISTA, M. **Canine semen freezing and artificial insemination**. In: KIRK, R.W. (ed), Current Veterinary Therapy X. Philadelphia: WB Saunders Company, p. 1247-1258, 1989.

CROSS, N. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 7-11, 1998.

CUNNINGHAM, J.G. **Gestação e parto**. In: Tratado de Fisiologia Veterinária. Editora Guanabara Koogan, 3^a. Ed., Rio de Janeiro, 2004, 579p.

DAVIS, R.O.; SIEMERS, R.J. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 857-869, 1995.

De LAMIRANDE E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 14, p. 157-166, 1993.

De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 18, p. 487-495, 1995a.

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

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. **J. Androl.**, v. 13, p. 368-386, 1995c.

De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Rev. Reprod.**, v. 2, p. 48-54, 1997.

De LEEUW, F.E.; de LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v. 3, p. 32-44, 1993.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos Animais Domésticos. O Macho-Inseminação Artificial**. Editorial Acribia, Zaragoza, 1980, 446 p.

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, p. 505-511, 1999.

ELZANATY, S.; RICHTHOFF, J.; MALM, J. et al. The impact of epididimal and accessory gland function on sperm motility. **Hum. Reprod.**, v. 17, p. 2904-2911, 2002.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: Review. **J. Reprod. Fertil.**, v. 47 (suppl), p. 243-255, 1993.

ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. Factors affectnig the viability of canine spermatozoa II. Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, v. 37, p. 373-381, 1992.

ESFANDIARI, N.; SHARMA, R.K.; SALEH, R.A. et al. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. **J. Androl.**, v. 24, p. 862-870, 2003.

ESKENAZI, B.; KIDD, S.A.; MARKS, A.R. et al. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. **Hum. Reprod.**, v. 20, p.1006-1012, 2005.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Hum. Reprod.**, v. 14, p. 1039-1049, 1999.

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. **J. Androl.**, v. 23, p. 25-43, 2002.

FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 71, p. 13-23, 2002.

FORD, W.C.L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Hum. Reprod. Update**, v. 10, p. 387-399, 2004.

FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p.11003-11006, 1991.

- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.
- GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; PAOLI, D. et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v. 15, p. 830-839, 2000.
- GIL-GUZMAN, E.; OLLERO, M.; LOPEZ, M.C. et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Hum. Reprod.**, v. 16, p. 1922-1930, 2001.
- GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.C. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl 54, p. 271-283, 1999.
- GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Livraria Varela, São Paulo, 2002, 340 p.
- GRAHAM, E.F.; SCHMEHL, K.L.; NELSON, D.S. Problems with laboratory assays. In: TECH CONF AI AND REPROD. MILWAUKEE, 8, 1980. Wisconsin. **Proceedings...** Wisconsin: NAAB, 1980, p. 1-8.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biol. Reprod.**, v. 43, p. 55-64, 1990.
- GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. **Int. J. Androl.**, v. 17, p.225-231,1994.
- GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. **Int. J. Androl.**, v. 20, p. 195-200, 1997.
- GRIVEAU, J.F.; DUMONT, E.; RENARD, P. et al. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 103, p. 17-20, 1995.
- GRIVEAU, J.F.; GRIZARD, G.; BOUCHER, D. et al. Influence of oxygen tension on function of isolated spermatozoa from ejaculated of oligozoospermic patients and normozoospermic donors. **Hum. Reprod.**, v. 13, p. 3108-3113, 1998.
- GUERRA, M.M.P. Importância dos oxidantes na fisiologia espermática. In: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2, 2005, Teresina. **Proceedings...** Teresina: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005. CD-ROOM.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 20, p. 185-236, 2004.

- GUERRA, M.M.P.; PEREIRA, R.J.T.A.; OLIVEIRA, M.A.L. Utilização do azul de tripam/giemsas para avaliar dois métodos de recuperação espermática de sêmen caprino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 21, p. 64-66, 1997.
- HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 1995, 6^a. Ed., Manole, São Paulo, SP, 582p
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford.1999. 936 p.
- HAMMADEH, M.E.; GEORG, T.; ROSEBAUM, P. et al. Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal semen. **Andrologia**, 33, 331-336, 2001.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 88, p. 343-352, 1990.
- HAY, M.A.; KING, W.A.; GARTLEY, C.J. et al. Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. **Theriogenology**, v. 48, p. 1329-1342, 1997.
- HELLSTROM, W.J.G.; BELL, M.; WANG, R. et al. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation. **Fertil. Steril.**, v. 61, p. 1117-1122, 1994.
- HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 51, p. 321-332, 1998.
- HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 26, p. 70-75, 1989.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.
- HSU, P.; LIU, M.; HSU, C. et al. Effects of vitamin E and /or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology**, v. 128, p. 169-179, 1998.
- HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; MCKELVEY, V.J. et al. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Hum Reprod.**, v. 13, p. 1240-1247, 1998.
- HUNTER, R.H.F.; HUANG, W.T.; HOLTZ, W. Regional influences of the Fallopian tubes on the rate of boar capacitation insurgically inseminated gilts. **J. Reprod. Fertil.**, v. 114, p. 17-23, 1998.
- IRVINE, D.S. Glutathione as a treatment for male infertility. **Rev. Reprod.**, v. 1, p. 6-12, 1996.

- IRVINE, D.S.; TWIGG, J.; GORDON, E.L. et al. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. **J. Androl.**, v.21, p.33-44, 2000.
- ISACHENKO, E.; ISACHENKO, V.; KATKOV, I.I. et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. **Hum. Reprod.**, v. 19, p. 932-939, 2004.
- IVANOVA-KICHEVA, M.G.; BOBADOV, N.; SOMLEV, B. Cryopreservation of canine semen in pellets and IN 5-ML aluminum tubes using three extenders. **Theriogenology**, v. 48, p. 1343-1349, 1997.
- JANSSEN, Y.M.; VAN-HOUTON, B.; BORM, P.J. et al. Cell and tissue responses to oxidative damage. **Lab. Invest.**, v. 69, p. 261-274, 1993.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Vet.**, v. 10, p. 156-165, 1994.
- JERVIS, K.M.; ROBAIRE, B. Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 696-703, 2001.
- 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. **Fertil. Steril.**, v. 31, p.531-537, 1979.
- JONES, R.D.; HANCOCK, J.T.; MORICE, A.H. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 29, p. 416-424, 2000.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.M. **Patologia Veterinária**. Manole, São Paulo, SP, p.1223-1237, 2000.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 6^a. ed. Editora Guanabara Koogan S.A: Rio de Janeiro, 1997, 299 p.
- KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; FORTE, T. et al. Recycling of vitamin E in low density lipoproteins. **J. Lipid. Res.**, v. 33, p. 385-397, 1992.
- KENNEY, R.M.; BERMAN, R.V.; COOPER, W.L. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 21, 1975, Boston. **Proceedings ...**, Boston, 1975. p. 327-336.
- KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular. Uma introdução à patologia**. Elsevier Editora Ltda., São Paulo, 2004, 654 p.
- KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A. et al. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen

species(ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v. 62, p. 1186-1197, 2004.

KOBAYASHI, H.; GIL-GUZMAN, E.; MAHRAN, A.M. et al. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. **J. Androl.**, v. 22, p. 568-574, 2001.

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.

LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Interaction between Ca^{2+} , cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human capacitation. **J. Androl.**, v.19, p. 434-443, 1998.

LEWIS, B.; AITKEN, R.J. Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 64, p. 1545-1556, 2001.

LEWIS, S.E.M.; STERLING, E.S.L.; YOUNG, I.S. et al. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertil. Steril.**, v. 67, p. 142-147, 1997.

LOPES, S.; SUN, J.; JURISICOVA, A. et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. **Fertil. Steril.**, v. 69, p. 528-532, 1998.

MAAS, D.H.A.; STOREY, B.T.; MASTROIANNI, L. Oxygen tension in the oviduct of the Rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Fertil. Steril.**, v. 27, p. 1312-1318, 1976.

MANN, T. **The biochemistry of semen and of the male reproductive tract**. London: Methuen and Co., 1964, 493 p.

MARCHETTI, C.; OBERT, G.; DEFFOZEZ, A. et al. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cellviability by flow cytometry in human sperm. **Hum.Reprod.**, v. 17, p. 1257-1265, 2002.

MARQUES, A.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. et al. Effects of ascorbic acid and pentoxifyline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.

MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G.; RHODES, S.L. et al. Fertility of superovulated ewes after intrauterine insemination with low numbers of fresh and frozen-thawed spermatozoa. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 5, p. 57-63, 1993.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 46, p. 408-418, 1997.

MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reprod. Fertil.**, v. 8, p.1013-1020, 1996.

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 8, p. 1165-1167, 1997.

MILLER, J.K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F.C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p.2812-2823, 1993.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. **J. Biol. Chem.**, v. 247, p. 188-192, 1972.

MOURA, C.S.; CAVALCANTI, M.C.O; GUERRA, M. M .P. et al. Cryopreservation of canine semen using different methods of refrigeration. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, p. 304-306, 1999.

MOURA, C. S.; CAVALCANTI, M.C.O.; GUERRA, M.M.P. et al. Teste de avaliação *in vitro* e criopreservação do sêmen de cão utilizando diferentes diluidores. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v. 9, p. 102-106, 2002.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. 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. et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. **Hum. Reprod.**, v.19, p.129-138, 2004.

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.

NUNES, J.F.; FERNÁNDEZ, D.R.P. **Biotecnicas de la Reproduccion Caprina y Ovina**. Gráfica e Editora 2M Ltda, Fortaleza, 2001, 105pp.

O'BRIEN, J.K.; HOLLINSHEAD, F.K.; EVANS, K.M. et al. Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in sheep and non-human primates. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 15, p. 367-375, 2003.

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Hum. Reprod. Update**, v. 5, p. 399-420, 1999.

OCHSENDORF, F.R.; BUHL, R.; BASTLEIN, A. et al. Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. **Hum. Reprod.**, v. 13, p. 353-359, 1998.

OLAR, T.T.; BOWEN, R. A.; PICKETT, B. W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures of postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. **Theriogenology**, v. 31, p. 451-461, 1989.

OMU, A.E.; FATINIKUN, T.; MANNAZHATH, N. et al. Significance of simultaneous determination of serum on seminal plasma α -tocopherol and retinol in infertile men by high-performance liquid chromatography. **Andrologia**, v. 31, p. 347-354, 1999.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARISH, J.L.; GRAHAM, J.K. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. **Theriogenology**, v. 51, p. 461-472, 1999.

PASQUALOTTO, F.F.; SHARMA, R.K.; NELSON, D.R. et al. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigations. **Fertil. Steril.**, v. 73, p. 459-464, 2000.

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 703-718, 2000.

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

PERIS, S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M. et al. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: Relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **J. Androl.**, v. 25, p. 224-233, 2004.

POLGE, C. Low temperature storage of mammalian spermatozoa. **Proc. Roy. Soc. Lond.**, v. 147, p. 488-508, 1957.

PROVINCE, A. C.; AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. et al. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. **Theriogenology**, v. 4, p. 409-415, 1984.

PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E.; OTTINGER, M.A. et al. Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibition. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 49, p. 48-57, 1998.

- RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. et al. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 462-470, 2001.
- RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D. et al Effect of centrifugation on *in vitro* survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p. 1669-1681, 2002.
- RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S. et al. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biol. Reprod.**, 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. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 26, p. 143-149, 1990.
- ROCA, J.; GIL, M.A.; HERNANDEZ, M. et al. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **J. Androl.**, v. 25, p. 397-405, 2004.
- ROLF, C.; COOPER, T.G.; YEUNG, C.H. et al. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomised, placebo-controlled, double-blind study. **Hum. Reprod.**, v. 14, p. 1028-1033, 1999.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M. et al. Heterologous *in vitro* fertilisation and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biol. Reprod.**, v. 58, p. 475-482, 1998.
- ROWE, P.J.; COMHAIRE, F.H.; HARGREAVE, T.B. et al. **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. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 38, p. 1-36, 1995.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. **J. Androl.**, v. 23, p. 737-752, 2002.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A.; NADA, E.A. et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. **Fertil. Steril.**, v. 79, p. 1597-1605, 2003.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A.; NELSON, D.R. et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. **Fertil. Steril.**, v. 78, p. 313-318, 2002.

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

SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, p. 835-850, 1996.

SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.R. et al The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Hum. Reprod.**, v. 14, p. 2801-2807, 1999.

SHNIZER, S.; KAGAN, T.; LANIR, A. et al. Modifications and oxidation of lipids and proteins in human serum detected by thermochemiluminescence. **Luminescence**, v. 18, p. 90-96, 2003.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense (Review). **Eur. J. Biochem.**, v. 215, p. 213-219, 1993.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A.R. Antioxidant function of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 669, p. 7-20, 1992.

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

SIKKA, S.C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, p. 851-862, 2001.

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

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

SIKKA, S.C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.J. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **J. Androl.**, v. 16, p. 464-481, 1995.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Congelamento de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de Tris e água de côco. **Ciênc. Rural**, v. 30, p. 1021-1025, 2000.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SOUZA, D. M. B. et al. Comparação entre os diluentes à base de água de côco e à base de Tris na criopreservação de sêmen canino. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 2, Fortaleza, 1997. **Anais...**, Fortaleza, 1997.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C. S.; UCHOA, D.C. et al. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on the semen freezing. **Vet. J.**, v. 164, p. 244-246, 2002.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C. et al. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v. 59, p. 821-829, 2003.

SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B. Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **Vet. Rec.**, v. 138, p. 154-157, 1996.

SILVA, L.D.M.; VERSTEGEN, J.P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 44, p. 571-579, 1995.

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

SIRIVAIYAPONG, S.; CHENG F.P.; MARKS, A.; VOORHOUT, W.F.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B. Effects of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. **Theriogenology**, v. 53, p. 789-802, 2000.

STEFANOV, R.; ANGELOVA, M.; STEFANOVA, T. et al. Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103 improves ram spermatozoa functions in vitro. **Andrologia**, v. 36, p. 51-56, 2004.

STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 3, p. 203-213, 1997.

SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 46, p. 89-96, 1997.

TAN, C.M.; XENOYANNIS, S.; FELDMAN, R.D. Oxidant stress enhances adenylyl cyclase activation. **Circuln. Res.**, v. 77, p. 710-717, 1995.

THIELE, J.J.; FREISLEBEN, H.J.; FUNCHS, J. et al. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. **Hum. Reprod.**, v. 10, p. 110-115, 1995.

TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E. 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. **Hum. Reprod.**, v. 13, p. 1429-1436, 1998.

- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E. et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 48, p. 269-278, 1997.
- URNER, F.; SAKKAS, D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 125, p. 17-26, 2003.
- URNER, F.; LEPPENS-LUISIER, G.; SAKKAS, D. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. **Biol. Reprod.**, v. 64, p. 1350-1357, 2001.
- VALCÁRCEL, A.; HERAS, M.A.; PEREZ, L. et al. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing by simultaneous lectin/hoechst 33258 staining. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 45, p. 299-309, 1997.
- VICARI, E.; CALOGERO, A.E. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatic-vesiculo-epididymitis. **Hum. Reprod.**, v. 16, p. 2338-2342, 2001.
- VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 1-6, 1998.
- WANG, A.W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I. et al. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, p. 921-925, 1997.
- WANG, X.; SHARMA, R.K.; SIKKA, S.C. et al. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertil. Steril.**, v. 80, p. 531-535, 2003.
- WANG, X.; SHARMA, R.K.; GUPTA, A. et al. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. **Fertil. Steril.**, v. 80, p. 844-50, 2003.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 5, p. 639-658, 1993.
- WHITE, D.R.; AITKEN, R.J. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. **Gamete Res.**, v. 22, p. 163-177, 1989.

WOLF, D.E.; HAGOPIAN, S.S.; ISOGIMA, S. Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation in vitro capacitation in the mouse. **J. Cell. Biol.**, v. 102, p. 1372-1377, 1986.

Yeung, C.H.; Cooper, T.G.; De Geyter, M. et al. Studies on the origin of redox enzymes in seminal plasma and their relationship with results of in-vitro fertilization. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 4, p. 835-839, 1998.

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

ZALATA, A.; HAFEZ, T.; COMHAIRE, F. Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. **Hum.Reprod.**, v. 10 , p. 1444-1451, 1995.

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. **Int. J. Androl.**, v. 16, p. 183-188, 1993.

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