

FELIPE COSTA ALMEIDA

**ESTUDO *IN VITRO* DA FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES
CRIOPRESERVADOS OBTIDOS NA CAUDA DO
EPIDÍDIMO DE TOUROS**

GARANHUNS

2013

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Unidade Acadêmica de Garanhuns
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes

FELIPE COSTA ALMEIDA

**ESTUDO *IN VITRO* DA FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES
CRIOPRESERVADOS OBTIDOS NA CAUDA DO
EPIDÍDIMO DE TOUROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra

Co-orientador:

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

GARANHUNS

2013

Ficha catalográfica

A447e Almeida, Felipe Costa
Estudo *in vitro* da fertilidade de espermatozoides
criopreservados obtidos na cauda do epidídimo de touros /
Felipe Costa Almeida. – Recife, 2013.
69 f. : il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra.
Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de
Ruminantes) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Unidade Acadêmica de Garanhuns, Recife, 2013.
Referências.

1. Espermatozoide 2. Epidídimo 3. Criopreservação
I. Guerra, Maria Madalena Pessoa, orientadora II. Título

CDD 636.208926


Universidade Federal Rural de Pernambuco
Unidade Acadêmica de Garanhuns
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes

**ESTUDO *IN VITRO* DA FERTILIDADE DE ESPERMATOZOIDES
CRIOPRESERVADOS OBTIDOS NA CAUDA DO EPIDÍDIMO DE
TOUROS**

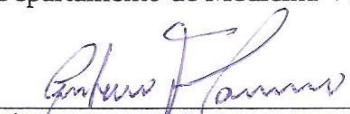
Dissertação elaborada por
Felipe Costa Almeida

Aprovada em 26/02/2013

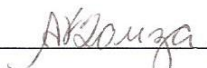
BANCA EXAMINADORA



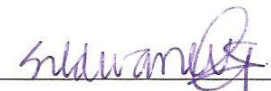
Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra
Orientadora - Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE



Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro
Co-orientador - Unidade Acadêmica de Garanhuns da UFRPE



Profa. Dra. Andreia Fernandes de Souza
Departamento de Zootecnia da UFRPE



Dra Sildivane Valcácia Silva
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

AGRADECIMENTOS

Em primeiro agradeço a Deus por me dar força, saúde e disposição para todos os dias iniciar a luta pela vida e pelo sucesso profissional, sem ele seria impossível esta batalha.

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de aprendizado, em especial professora Madalena, por todos os ensinamentos e orientação no estágio, na iniciação científica, no ESO e no mestrado, e a todos os outros professores como Gustavo Ferrer, Wilton Júnior, Cláudio Coutinho e Pierre Castro. E aos funcionários da universidade, Joana, Alcir, Dona Sônia e a todos os outros que aqui não foram mencionados. Muito obrigado!

Ao Androlab pela oportunidade de trabalho, foi muito bom trabalhar com vocês. Aos que trabalharam diretamente na pesquisa Sildivane, André, Helder, Wilton, Adalberto. E aos que torceram pela execução deste Ellen, Lucinha, Andreia Souza e Joane.

Aos Veterinários André e Sildivane, que sempre me orientando, ensinando, aconselhando e cobrando, se tornaram grandes amigos. Muito obrigado!

Aos meus pais Silvio e Augusta, meus irmãos Zezé e Camila e as minhas avós Maria e Letísia (in memorian) pelo amor, carinho, dedicação, incentivo, ensinamentos, pelos exemplos de vida e dignidade, por serem meu porto seguro, amo vocês.

A toda a minha família: padrinhos, tios, primos e agregados... Não tenho como citar nomes aqui. Sou um felizado em ter nascido em uma família tão grande e tão unida, muito obrigado a todos. A minha namorada Thissiane pelo companheirismo, dedicação, paciência e por todos os momentos que passamos juntos, Te Amo.

A empresa Ciclo pela disponibilidade em liberar o seu laboratório de rotina para realizarmos uma parte do trabalho, em nome da Dra. Cida, que se prontificou a trabalhar nas suas horas de descanso, a Agnaldo pela sua receptividade e a Leo por ser muito prestativo. Não podendo esquecer o apoio de Carlitinho e Dr. Orcalino.

A Marcel Moade, que liberou os matadouros Frigoalas e Frigosserra para pegar os ovários necessários para a FIV, e as veterinárias dos matadouros Pedrita e Radija, que foram muito solícitas e disponíveis.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a fertilidade de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros da raça Nelore e submetidos à criopreservação em diluentes com três diferentes concentrações de glicerol, tempos de estabilização a 5 °C e adição de antioxidantes ao diluidor de sêmen. Os epidídimos foram obtidos em matadouro, até uma hora após a morte do animal, colocados em sacos plásticos individuais e transportados em caixa térmica em temperatura ambiente (28 °C). No laboratório, os espermatozoides foram recuperados da cauda do epidídimo utilizando a técnica de flutuação e, a seguir, diluídos em Tris-gema. No experimento 1 foi avaliado diferentes concentrações de glicerol (3%, 5% e 7%) em diferentes tempos de estabilização (0h, 2h e 4h). No experimento 2 foi avaliado o efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na criopreservação de espermatozoides epididimários, constituindo os seguintes grupos experimentais: (Controle; CAT 50 e 100 U/mL; SOD 50 e 100 U/mL), na concentração de 60×10^6 espermatozoides/mL, acondicionados em palhetas (0,25 mL) e congelados em método automatizado. Em ambos os experimentos, as amostras de sêmen foram descongeladas a 37 °C/ 30 s e avaliadas quanto a integridade de membrana plasmática (iMP), integridade acrossomal (iAc), potencial de membrana mitocondrial (PMM) e cinética espermática. No experimento 1, as análises de iMP e iAc apresentaram valores inferiores ($P < 0,05$) para o glicerol 3%, no tempo de 4h em comparação aos demais tempos de estabilização. Na avaliação da cinética espermática, foram encontrados valores inferiores ($P < 0,05$) para o parâmetro BCF nos tratamentos glicerol 3% e 7%, no tempo de 2h em comparação ao do glicerol 5%; para ALH, o grupo glicerol 3%, no tempo 4h de estabilização apresentou menor valor ($P < 0,05$) em relação aos demais grupos. O grupo glicerol 5%, no tempo de estabilização 0h, apresentou valores inferiores ($P < 0,05$) para os parâmetros de aPMM e iAc, quando comparado aos demais grupos. Para a FIV foi utilizado o grupo glicerol 5%, no tempo de estabilização 4h. Foram obtidos 40% de viabilidade embrionária dos oócitos utilizados. No experimento 2, os parâmetros de MT, MP, VCL, VSL, VAP, STR, ALH e BFC não diferiram ($P > 0,05$) entre o grupo controle e os grupos tratados. Todavia, diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre os grupos para Linearidade (LIN) e no índice de oscilação (WOB), sendo o tratamento SOD 100 inferior ($P < 0,05$) aos demais grupos. A adição de SOD 100 determinou ainda menores ($P < 0,001$) porcentagens de blastocistos pós-clivagem. Com base nos resultados de cinética e fertilização *in vitro*, é possível concluir que a criopreservação de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros deve ser realizada utilizando diluidor com glicerol na concentração de 5% e tempo de estabilização a 5 °C de 4h. A adição de CAT nas concentrações de 50 e 100 U/mL e SOD na concentração de 50 U/mL não influencia na qualidade espermática. A adição de SOD na concentração de 100 U/mL reduz a fertilidade dos espermatozoides epididimários pós-criopreservação. Todavia, ressalta-se que espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros podem ser utilizados com sucesso em programas de FIV.

Palavras-chave: Espermatozoide epididimário, tempo de estabilização, antioxidantes e glicerol.

ABSTRACT

This work aimed to study fertility of sperm obtained from epididymis tail of Nelore bulls and subjected to cryopreservation in extenders with three different concentrations of glycerol, and stabilization times at 5 °C and antioxidants addition to semen extender. Epididymides were obtained from slaughterhouse up to one hour after the death of the animal, placed in individual plastic bags and transported in box at room temperature (28 °C). At the laboratory, spermatozoa were recovered from epididymis tail using flotation technique and then diluted in Tris-yolk egg. In experiment 1 three concentrations of glycerol (3%, 5% and 7%) was evaluated at different stabilization times (0h, 2h and 4h). In the second experiment was evaluated the effect of adding enzymatic antioxidants in epididymal spermatozoa cryopreservation, resulting in following experimental groups: (Control; CAT 50 and 100 U/mL, and SOD 50 and 100 U/mL) at a concentration of 60×10^6 sperm/mL, packaged in straws (0.25 mL) and frozen in automated system. In both experiments, semen samples were thawed at 37 °C/30 sec was evaluated for plasma membrane integrity (PMi), acrosomal integrity (Aci), mitochondrial membrane potential (MMP) and sperm kinematics. In Experiment 1, PMi and Aci analyzes demonstrated values lower ($P < 0.05$) for glycerol 3%, at stabilization time at 4h compared to other times. In kinematic evaluation, sperm values were lower ($P < 0.05$) for BCF parameter in glycerol 3% and 7% groups at 2h of stabilization time compared to glycerol 5%; for ALH, glycerol 3% group in stabilization time at 4h demonstrated lowest ($P < 0.05$) compared to other groups. Glycerol 5% group, settling time 0h, showed lower values ($P < 0.05$) for the hPMM and Aci parameters, when compared to other groups. For IVF experiment, only glycerol 5% at stabilization time at 4h was used. Forty percents of embryonic viability were obtained from oocytes used. In experiment 2, parameters of MT, MP, VCL, VSL, VAP, STR, ALH and BFC did not differ ($P > 0.05$) between control and treated groups. However, significant differences ($P < 0.05$) were observed between groups for Linearity (LIN) and oscillation index (WOB), being less than 100 SOD treatment ($P < 0.05$) than other groups. Addition of SOD 100 determined lower ($P < 0.001$) percentages of blastocysts post-cleavage. Based on results of kinematic and *in vitro* fertilization, it is possible to conclude that spermatozoa cryopreservation obtained from epididymis tail of bulls should be performed using extender with glycerol at 5% of concentration and stabilization time at 5 °C during 4h. Addition of CAT concentrations of 50 and 100 U/mL and SOD at concentration of 50 U/mL did not affect the sperm quality. Addition of SOD at a concentration of 100 U/mL reduces fertility of epididymal sperm after cryopreservation. However, it is noteworthy that sperm obtained from epididymis tail of bulls can be successfully used in IVF programs.

Keywords: Spermatozoa, epididymis, cryopreservation.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1 -	Representação esquemática do testículo e epidídimo, nas suas subdivisões.	4
Figura 2 -	Representação esquemática da reação da Superóxido Dismutase	11
Figura 3 -	Representação esquemática da reação da Catalase	13

LISTA DE TABELAS

Experimento 1		Página
Tabela 1.	Porcentagem (média \pm dp) dos parâmetros de integridade de espermatozoides bovinos obtidos na cauda do epidídimo de touros Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, submetidos a diferentes concentrações de glicerol em diferentes tempos de estabilização a 5 °C	45
Tabela 2.	Porcentagem (média \pm dp) dos parâmetros cinéticos de espermatozoides bovinos obtidos na cauda do epidídimo de touros Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, submetidos a diferentes concentrações de glicerol em diferentes tempos de estabilização a 5 ° C.....	46
Experimento 2		
Tabela 1.	Porcentagem (média \pm dp) dos parâmetros de integridade de espermatozoides bovinos obtidos na cauda do epidídimo de touros Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, acrescido ou não de antioxidantes enzimáticos.....	59
Tabela 2.	Porcentagem (média \pm dp) dos parâmetros cinéticos de espermatozoides bovinos obtidos na cauda do epidídimo de touros Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, acrescido ou não de antioxidantes enzimáticos.....	60
Tabela 3.	Avaliação da taxa de clivagem através de fertilização <i>in vitro</i> em oócitos obtidos em matadouros, e fertilizados com espermatozoides obtidos na cauda do epidídimo de touros da raça Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, acrescido ou não de antioxidantes enzimáticos.....	61
Tabela 4.	Avaliação da taxa de blastocistos em oócitos clivados através de fertilização <i>in vitro</i> em oócitos obtidos em matadouros, e fertilizados com espermatozoides obtidos na cauda do epidídimo de touros da raça Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, acrescido ou não de antioxidantes enzimáticos.....	61
Tabela 5.	Avaliação da taxa de blastocistos através de fertilização <i>in vitro</i> em oócitos obtidos em matadouros, e fertilizados com espermatozoides obtidos na cauda do epidídimo de touros da raça Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, acrescido ou não de antioxidantes enzimáticos.....	61

SUMÁRIO

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3 Revisão de Literatura.....	4
4 Referencias Bibliográficas	19
5 Experimentos.....	31
5.1 Avaliação de diferentes concentrações de glicerol e tempos de estabilização na criopreservação de sêmen obtido da cauda do epidídimo de touros Nelore.....	32
5.2 Efeito da adição de Catalase e Superoxido Dismutase ao diluente de congelamento de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros da raça Nelore.....	47

1 INTRODUÇÃO

O reprodutor bovino, como parte imprescindível à cadeia de produção animal, deve apresentar eficiente potencial de fertilidade *in vitro* e *in vivo*, ou seja, capacidade de fecundação. Em particular, o potencial reprodutivo *in vitro* é cada vez mais utilizado para garantir a rápida transmissão de características produtivas desejáveis. Nesse sentido, tem-se procurado, por intermédio das técnicas de reprodução assistida, testar e utilizar todas as estruturas celulares espermáticas que possam apresentar capacidade fecundante, como: as células primordiais oriundas dos túbulos seminíferos (MARTINS et al., 2000), os espermatozoides epididimais (KIKUCHI et al., 1998; ALMEIDA et al., 2012) e os ejaculados (BILODEAU et al., 2000).

A morte inesperada, os processos obstrutivos ou os distúrbios traumáticos podem interromper prematuramente a vida reprodutiva de touros de alto valor genético. Nesses casos, novas formas de colheita de espermatozoides têm sido estudadas com o objetivo de preservar a genética valiosa destes animais. Somente nos últimos anos, alguns pesquisadores intensificaram o estudo da recuperação e preservação de espermatozoides viáveis obtidos da cauda do epidídimo (TIPLADY et al., 2002; HERRERA et al., 2006; PAPA et al., 2008a; MONTEIRO et al., 2009). Isto ocorreu devido ao crescente interesse pela preservação de espécies ameaçadas de extinção e de células espermáticas obtidas de animais de produção, impossibilitados de realizar cobertura ou colheita de sêmen com vagina artificial. O sêmen da cauda do epidídimo tem sido utilizado em programas de reprodução assistida com alguns resultados positivos em espécies domésticas e selvagens, tais como: equinos, bovinos, caprinos, caninos, cervídeos (GOOVAERTS et al., 2006).

Tais estudos concentraram-se no desenvolvimento e no aprimoramento de técnicas de colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo (CARY et al., 2004), na comparação de diluentes (MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008a), na refrigeração espermática (MONTEIRO et al., 2009), no efeito da adição de plasma seminal (MORRIS et al., 2002; TIPLADY et al., 2002; MOORE et al., 2005; HEISE et al., 2010), na viabilidade espermática de garanhões subférteis (MONTEIRO et al., 2011), na fertilidade (MELO et al., 2008; PAPA et al., 2008a; HEISE et al., 2010), nos métodos de inseminação artificial (IA) (MORRIS, 2002) e na injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) (HERRERA et al., 2006).

Estudos demonstraram que os espermatozoides, à temperatura ambiente, são considerados viáveis até 24 horas de armazenamento, pós-orquiectomia, e podem ser utilizados em IA e ICSI. Após a morte do animal, os espermatozoides permanecem viáveis no epidídimo até que a decomposição tecidual afete sua viabilidade (BRUEMMER et al., 2002; MURADÁS et al., 2006). Se os epidídimos forem armazenados a 5 °C, a viabilidade espermática pode ser mantida por maior período de tempo (BRUEMMER et al., 2002). Entretanto, não é possível prever a capacidade fecundante destas células, visto que nenhum estudo comparou sua fertilidade com a dos espermatozoides obtidos a partir do ejaculado.

O sucesso recentemente alcançado com os índices de fertilidade dos espermatozoides recuperados do epidídimo em equinos mostra a importância da realização de estudos que testem protocolos de acondicionamento e criopreservação destas células. Tais estudos tornam-se ainda mais relevantes quando se considera que a colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo pode, em alguns casos, ser a última chance de preservação espermática de alguns animais (MARTINS et al., 2007).

A bovinocultura de corte é o setor mais produtivo da pecuária do Brasil, considerado o maior exportador de carne bovina do mundo. Este sucesso está relacionado à implantação de biotecnologias da reprodução no rebanho, aumentando a sua produtividade. Embora o uso de espermatozoides frescos recuperados do epidídimo seja um procedimento alternativo, a criopreservação destes gametas permite, de forma mais eficiente e econômica, a utilização do material genético de um reprodutor por um maior período de tempo e não apenas após um curto período depois de sua morte.

Esse trabalho tem como objetivo definir a melhor concentração de glicerol e o melhor tempo de estabilização para a congelação de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros Nelore, assim como avaliar o efeito da adição de antioxidantes (Superoxido dismutase e Catalase) ao diluidor de congelação de espermatozoides bovinos obtidos do epidídimo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a fertilidade *in vitro* de espermatozoides criopreservados obtidos da cauda do epidídimo de touros da raça nelore (*Bos taurus indicus*).

2.2 Objetivos Específicos

- a) Estudar o efeito da utilização de três diferentes concentrações de glicerol em três tempos de estabilização à 5 °C na viabilidade de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de reprodutores bovinos;
- b) Estudar o efeito da adição de Superóxido dismutase e Catalase na viabilidade de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de reprodutores bovinos;
- c) Estudar a viabilidade de espermatozoides obtidos da cauda de epidídimo na Fertilização *in vitro*.

3 REVISAO DE LITERATURA

A recuperação e a criopreservação de espermatozoides do epidídimo obtidos de animais mortos (recuperação pós-morte) é uma opção viável para preservar gametas masculinos e, dessa forma, manter um banco de germoplasma (TITTARELLI et al., 2006). Os procedimentos de isolamento de espermatozoides do epidídimo de animais mortos, a criopreservação e subsequente utilização para a fecundação *in vitro* (FIV), são importantes ferramentas para resgatar material genético que poderia ser perdido, tanto de animais de produção quanto de espécies em extinção (MARTINS et al., 2007).

O epidídimo tem uma estrutura compacta, plana e alongada intimamente ligada à parte mais ventral do testículo e, em bovinos, o ducto epididimário pode alcançar o comprimento total de 40 metros (HOSKINS et al., 1978). O epidídimo é dividido em cabeça, corpo e cauda (Figura 1), e se caracteriza por apresentar três compartimentos: o lúmen do ducto, contendo os espermatozoides e líquido epididimal, o epitélio de revestimento do lúmen e o tecido conectivo, contendo elementos vasculares, musculatura lisa e nervos que formam o tecido extraducto (VARRICCHIO et al., 1996). O epitélio da mucosa epididimal é pseudoestratificado prismático com estereocílios, que são processos imóveis e servem para aumentar a superfície de absorção e/ou secretora do revestimento (AMANN, 1995).

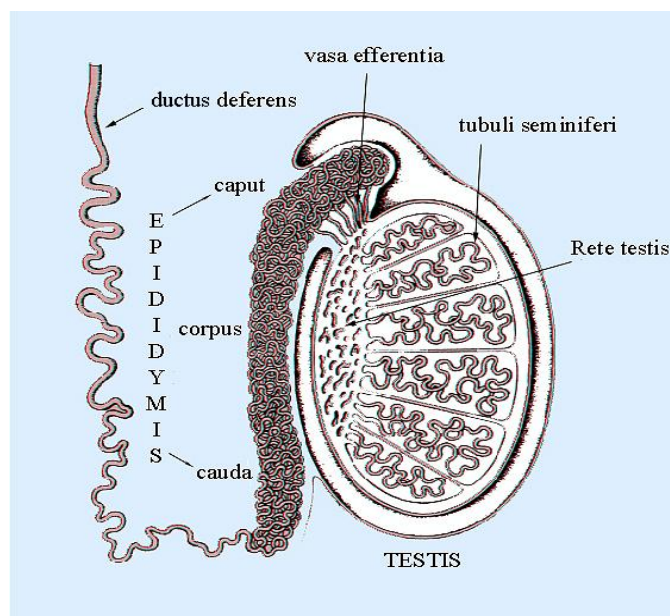


Figura 1. Representação esquemática do testículo e epidídimo, nas suas subdivisões (Fonte: De Pauw, 2003).

O epidídimo é composto por um tecido, onde os andrógenos controlam o metabolismo de secreção e maturação dos espermatozoides (BROOKS, 1983). A concentração de andrógenos no epidídimo é muito elevada, principalmente na região da cabeça, em comparação com a concentração encontrada no soro sanguíneo (PUJOL et al., 1976).

Os ductos eferentes e epidídimos têm como funções a remoção de secreções, conduzindo os espermatozoides a partir dos túbulos seminíferos, o transporte dos espermatozoides diretamente para o ducto deferente por contrações da musculatura lisa, a maturação dos espermatozoides e a manutenção e armazenamento destas células férteis em número suficiente para realizar a fecundação (AMANN, 1995). O primeiro segmento do epidídimo é responsável pela reabsorção, enquanto o segundo segmento está relacionado à maturação espermática e o segmento terminal possui a função de armazenamento espermático (AMANN, 1986).

O tempo de permanência dos espermatozoides no epidídimo difere entre espécies e em cada segmento deste órgão. Em bovinos, os espermatozoides permanecem durante 2,5 dias na cabeça, 0,6 dia no corpo e 5,2 dias na cauda, totalizando, aproximadamente, 9 dias. No entanto, o período de permanência na cauda do epidídimo pode ser reduzido ou aumentado, de acordo com a frequência utilização do reprodutor, com risco de esgotar a reserva destes gametas na cauda (AMANN, 1976).

Durante o seu trajeto pelo epidídimo, os espermatozoides sofrem alterações morfo-funcionais importantes, como migração da gota citoplasmática da posição proximal para distal (CRABO et al., 1975), condensação da cromatina (HINGST et al., 1995), e adquire a habilidade para reconhecer e se ligar ao oócito (MOORE et al., 1983). Todavia, o início da motilidade pode ser considerado uma das modificações mais importantes que ocorrem durante a maturação espermática. Isto pode ser explicado por alterações bioquímicas e físicas da membrana do espermatozoide e do plasma do epidídimo, em combinação com o aumento da concentração espermática, diminuição do pH intracelular, alterações na concentração de íons de Ca^{2+} livres e na velocidade de transporte de glicose no espermatozoide (HIIPAKKA e HAMMERSTEDT, 1978; AMANN et al., 1993).

A cauda do epidídimo fornece um ambiente adequado para estocar gametas em situações fisiológicas e, assim, poder prolongar a sobrevivência espermática (FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2009). Apesar de a cauda do epidídimo oferecer boas condições para manter a viabilidade espermática quando longos períodos são necessários

até a recuperação dos espermatozoides, a refrigeração do epidídimo é necessária para minimizar os efeitos sobre os espermatozoides (YU e LEIBO, 2002; MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2005).

Espermatozoides bovinos são armazenados num estado quiescente na cauda do epidídimo antes da ejaculação (CASCIERI et al., 1976; CARR e ACOTT, 1984). Neste estado, os espermatozoides são imóveis e metabolicamente inativos (AMANN, 1986), presumivelmente para conservar reservas energéticas necessárias para a sua passagem através do trato reprodutivo feminino e para o processo de fertilização (MANN e LUTWAK-MANN, 1981). Além disso, este estado conduz a uma diminuição do risco de alterações na estrutura da membrana interna e na composição bioquímica por agentes oxidantes endógenos produzidos pela atividade mitocondrial (HAMAMAH e GATTI, 1998). Esta inibição pode ser explicada por baixo pH encontrado na cauda do epidídimo (TURNER e REICH, 1985), pressão hiperosmótica, baixa concentração de oxigênio e elevada concentração de espermatozoides armazenados (AMANN, 1986).

Outro fator importante para a manutenção da qualidade dos espermatozoides na cauda do epidídimo é a presença de substâncias antioxidantes. Em espermatozoide de suínos foram encontrados antioxidantes nas seguintes concentrações: Superóxido dismutase (SOD) 412.00 ± 24.90 UI/ 10^9 espermatozoides, Glutaciona peroxidase (GPx) 0.10 ± 0.03 UI/ 10^9 espermatozoides, Glutaciona redutase (GR) 0.11 ± 0.03 UI/ 10^9 espermatozoides, apesar de não ter sido evidenciado Catalase (CAT) (KOZIOROWSKA-GILUN et al., 2011). Quando pesquisado no fluido epididimário, estas substâncias foram encontradas nas seguintes concentrações: SOD 242.0 ± 24.45 UI/mL, GPx 0.79 ± 0.006 UI/mL, GR 0.02 ± 0.003 UI/mL e CAT 11.08 ± 3.18 UI/mL (KOZIOROWSKA-GILUN et al., 2011).

Avaliando a diferença entre os espermatozoides provenientes do ejaculado e do epidídimo, em touros, Silva et al. (2003) observaram que os gametas do epidídimo apresentaram maior taxa de defeitos menores e maiores, e que nos defeitos menores prevaleceu a ocorrência de gota citoplasmática distal. Estas patologias aparecem em função do incompleto desenvolvimento funcional das células epiteliais do epidídimo e caracteriza os espermatozoides imaturos (BARTH e OKO, 1989). O seu número deve se reduzir com a idade, ou seja, com a maturação do espermatozoide (SILVA et al., 2003). No entanto, os espermatozoides epididimais, mesmo apresentando gota citoplasmática distal, possuem habilidade de fecundar oócitos, conforme foi observado por Martins et al. (2000) em

bovinos pertencentes a programa de recuperação, preservação e multiplicação de material genético de raças em perigo de extinção.

Para Silva et al. (2003), os espermatozoides provenientes do epidídimo só devem ser utilizados caso possuam taxa de motilidade superior a 50%, mesmo portadores da gota citoplasmática distal. Nestas condições, os espermatozoides podem ser utilizados na IA e, principalmente, nas técnicas de reprodução assistida, como a FIV e a ICSI, tanto a fresco quanto pós-descongelamento, uma vez que a manipulação de sêmen com espermatozoides apresentando gota citoplasmática distal ocasiona a liberação da mesma.

Os protocolos utilizados para criopreservação submetem as células espermáticas a situações de estresse, com diminuição de sua viabilidade. Entre outras situações, se sobressaem os fatos de os espermatozoides serem submetidos a temperaturas não fisiológicas e à formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular, assim como ao estresse osmótico causado pela elevada concentração de solutos no meio diluidor (WATSON, 2000).

Para minimizar os danos causados pelo processo de criopreservação, muitos estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver um meio em que o mínimo de espermatozoides seja perdido e que atenda todas as qualidades como: permitir a preservação da motilidade e da integridade da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides, por estabilizar o pH do meio, neutralizar produtos tóxicos produzidos pelos espermatozoides, proteger os mesmos contra o choque térmico, manter o equilíbrio eletrolítico e a pressão osmótica compatível com os espermatozoides, atuar como fonte de energia, estabilizar sistemas enzimáticos, além de inibir o crescimento bacteriano (ENGLAND, 1993; PICKETT e AMANN, 1993).

Em geral, os meios para criopreservação de sêmen contêm um crioprotetor penetrante (glicerol, etilenoglicol ou dimetil sulfoxido), um crioprotetor não-penetrante (gema de ovo ou leite), um tampão (Tris ou PBS), açúcares (glucose, frutose, sacarose, trealose ou rafinose), sais (citrato de sódio ou ácido cítrico) e antibióticos (penicilina, gentamicina ou estreptomicina) (PURDY, 2006).

O glicerol é um álcool polihidrico altamente permeável, e o crioprotetor mais empregado na congelamento de sêmen nas diferentes espécies. Sua concentração ótima pode ser influenciada por outros componentes do diluidor, além da curva de refrigeração e do protocolo de congelamento e descongelamento. Contudo, o fator determinante está relacionado com a espécie, embora seu efeito tóxico sobre os espermatozoides seja observado em

elevadas concentrações, levando à perda da capacidade de fertilizar, o que pode ser restaurado quando o mesmo é removido (HOLT, 2000).

A utilização de gema de ovo como crioprotetor tem aumentado a capacidade fertilizante dos espermatozoides, tanto em sêmen armazenado em temperatura ambiente (PHILLIPS e LARDY, 1940) quanto nas células espermáticas submetidas à refrigeração ou congelamento (MANJUNATH, 2002). Este mesmo autor explica que a defesa promovida pela gema de ovo é devido às lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ligarem-se às proteínas do plasma seminal bovino (BSP), não permitindo que as BSPs desestabilizem a membrana dos espermatozoides.

A proteção oferecida pelo leite desnatado nos meios diluidores é dada pela interação das proteínas BSP com as micelas de caseína, α -lactalbumina e β -lactoglobulina, que são as principais proteínas do leite. Esta interação indica que o efeito protetor do leite ao espermatozoide é semelhante ao promovido pela gema de ovo. No entanto, diferenciam-se pelo mecanismo de proteção que ocorre no leite, que consiste na interação proteína-proteína e na gema de ovo pela interação lipídio-proteína (LUSIGNAN, 2011).

Muitos estudos tem se concentrado na busca de um crioprotetor com as funções do leite e da gema de ovo, mas que não seja de origem animal. A lecitina de soja pode ser uma opção, por ser um fosfolipídio e constituir o principal componente da fração fosfato da gema de ovo e da soja (CAMPBELL e FARREL, 2007). Vidal et al. (2013), utilizando diferentes concentrações de lecitina, observaram que diluentes contendo lecitina de soja como fonte de lipídio/lipoproteína pode ser uma alternativa aos produtos de origem animal em diluentes para congelamento de sêmen caprino.

Para obtenção de espermatozoides epididimais, muitos métodos de recuperação descritos na literatura variam com a espécie animal e com a forma de execução. No caso dos pequenos animais, devido ao tamanho do epidídimo, o método de preferência (flutuação) consiste em seccionar a cauda do epidídimo em várias porções e deixar o fluido obtido repousar em um meio gelatinoso, desta maneira, os espermatozoides migram para o meio e são recuperados através de filtração (YU e LEIBO, 2002). Esta técnica também é usada para obter amostras de espermatozoides de grandes animais (HISHINUMA et al., 2003).

Uma técnica similar consiste em realizar numerosas secções na cauda do epidídimo e pressionar suavemente esta estrutura, a fim de se proceder à colheita dos espermatozoides por extravasamento (KAABI et al., 2003). Outra possibilidade é a utilização de uma agulha

para perfurar os túbulos (BARTELS et al., 2000). Além disso, KISHIKAWA et al. (1999) utilizaram pinças para comprimir a cauda do epidídimo de ratos e recuperar os espermatozoides.

Outro método consiste em promover um fluxo retrógrado na cauda do epidídimo, aplicando pressão nos vasos deferentes até que o conteúdo desta porção do epidídimo seja extravasado através de um corte realizado na junção com o corpo do epidídimo (GARDE et al., 1994). A pressão é gerada com uma seringa, que injeta ar ou algum líquido não prejudicial aos espermatozoides (PBS, TRIS, entre outros) ou algum tipo de diluente (GRANEMANN, 2006).

Um fator limitador da técnica de recuperação de sêmen da cauda do epidídimo pode ser o tempo e a temperatura em que este órgão é mantido desde a morte do animal até o processamento do sêmen (TAJIK et al., 2007). Em carneiros foi observado que os espermatozoides permanecem viáveis até 48 horas após a morte do animal, porém foi constatado um decréscimo significativo da capacidade fertilizante destes gametas em função do aumento do tempo de manipulação (KAABI et al., 2003). Este decréscimo pode ser explicado pelo envelhecimento e esgotamento metabólico dos espermatozoides, assim como pelo processo de degeneração tecidual pós-morte. Ressalta-se, todavia, que temperaturas mais baixas retardam o processo de degeneração e diminuem o metabolismo dos espermatozoides, mantendo-os viáveis por maior período de tempo (GRANEMANN, 2006).

Tajik e Hassan-Nejad Lamsou (2008), utilizando testículos de dromedários obtidos em matadouro, investigaram a proporção de espermatozoides normais em cada parte do epidídimo (cabeça, corpo e cauda), identificando as principais patologias e porcentagens de vivos e mortos. Todavia, estes autores não encontraram diferença significativa entre as porcentagens de gametas normais obtidos das diferentes porções do epidídimo. Este resultado corroborou com aquele anteriormente descrito por SILVA et al. (2003). No entanto, a taxa de patologias é maior quando o sêmen é obtido da cauda do epidídimo, quando comparado àquele obtido do ejaculado (COSTA et al., 2011).

A criopreservação é a melhor forma de conservar o material genético, porém causa danos à célula espermática. A membrana plasmática do espermatozoide é considerada o local primário de danos durante o processo de criopreservação (WATSON, 1995). Alguns estudos têm demonstrado que o efeito osmótico e da temperatura, determinados pelos procedimentos de congelação e descongelação, induzem grandes alterações no volume de

água, resultando em considerável estresse mecânico nas membranas celulares (NOILES et al., 1995).

Muitos danos ocorridos durante a criopreservação dependem da estabilidade estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides (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, como por exemplo, alta relação entre ácidos graxos saturados e insaturados (NOILES et al., 1995).

A possível explicação para esse processo baseia-se no fato de que as membranas de espermatozoides de mamíferos serem ricas em ácidos graxos poli-insaturados, que as tornam muito fluida e, ao mesmo tempo, muito susceptível a danos peroxidativos induzidos pelos oxidantes (SIKKA et al., 1982), determinando perda da função da membrana (AGARWAL e SAID, 2003) e da integridade do DNA (AITKEN e KRAUSZ, 2001; SALEH et al., 2002; MOUSTAFA et al., 2004).

Os oxidantes são espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado e se comportam como moléculas altamente reativas, podendo causar danos por reagirem com biomoléculas, subtraindo elétrons para alcançar sua estabilidade. Os substratos moleculares mais frequentes incluem os ácidos graxos das membranas celulares e nucleotídeos no DNA, proteínas e carboidratos (ORTEGA et al., 2003). As espécies de oxigênio reativo (ROS) englobam formas reduzidas de oxigênio e seus produtos de reação com outras moléculas, podendo alguns deles ser radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Em condições normais, os mecanismos antioxidativos celulares, presentes em quase todos os tecidos e suas secreções, são responsáveis por inibir a elevada produção de ROS, protegendo as células de danos oxidativos (JONES et al., 1979). A diluição do sêmen utilizada nos processos de criopreservação promove a redução da concentração de antioxidantes, resultando no desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, e, conseqüentemente, no estresse celular (BILODEAU et al., 2000).

Os antioxidantes podem atuar de duas maneiras: como removedor do agente oxidante antes que haja a lesão celular (glutathione reduzida, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e a vitamina E), ou como agente removedor da lesão já ocorrida (ácido ascórbico, glutathione reductase e glutathione peroxidase). Em sua maioria, estes elementos antioxidantes encontram-se no meio intracelular, excluindo-se apenas a vitamina

E, que também é constituinte estrutural da membrana espermática (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Possivelmente existem dois sistemas produtores de ROS, um localizado na membrana plasmática e outro na peça intermediária (GUERRA et al., 2004). Esta propriedade dos espermatozoides em produzir quantidades controladas de ROS endógeno tem por objetivo induzir a capacitação espermática e a reação do acrossoma, promovendo a habilidade fertilizante. Isto porque baixas e controladas concentrações de ROS possuem papel importante na fisiologia espermática (DE LAMIRANTE et al., 1997), uma vez que a capacitação espermática é um processo oxidativo (ORTEGA et al., 2003).

Em uma monta natural, os espermatozoides são expostos principalmente a condições anaeróbias, reduzindo assim o potencial de danos causados por ROS. Além disso, os fluidos do oviduto contem concentrações de taurina consideráveis (MILLER e SHULTZ, 1987), sendo considerada importante para proteger as células da acumulação de ROS, quando são expostos a condições aeróbicas (ALVAREZ e STOREY, 1983; HOLMES et al., 1992). Quando o sêmen é utilizado em programas de reprodução assistida, seja ele por fertilização *in vitro* ou *in vivo*, este será exposto ao oxigênio e à radiação de luz visível durante os vários procedimentos do processamento, o que pode determinar formação de ROS e danos à motilidade celular e integridade do DNA (FOOTE et al., 2002).

As Superoxido dismutases (SOD) foram as primeiras enzimas que metabolizam as ROS a serem descobertas (ALVAREZ et al., 1987). Nos sistemas eucariontes existem duas formas de SOD, a localizada na mitocôndria (Mn-SOD) e a localizada no citosol (CuZn-SOD) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A Mn-SOD tem no manganês o seu sítio ativo, sendo uma enzima antioxidante primária que remove os ânions superóxidos (Figura 2) produzidos pela cadeia respiratória na mitocôndria, principal fonte de radicais livres no interior da célula (MATÉS, 2000). A CuZn-SOD possui o cobre e o zinco em seu sítio ativo, sendo o cobre essencial para sua atividade enzimática catalítica e o zinco para dar estabilidade à sua estrutura proteica (MATÉS, 2000). No espermatozoide humano a SOD tem um importante papel na prevenção da peroxidação lipídica (STOREY, 1997).

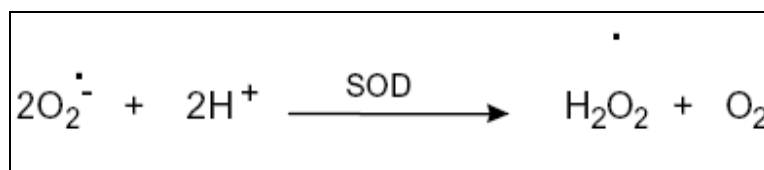


Figura 2. Representação esquemática da reação Superoxido Dismutase. (Fonte: SILVEIRA, 2004).

Beorlegui et al. (1997) verificaram uma correlação entre maior motilidade e maiores níveis de SOD no sêmen de touros holandeses (*Bos Taurus*). Além disso, estes autores descreveram que, nestas mesmas amostras, foram encontradas maiores percentagens de espermatozoides que sofreram reação acrossômica induzida por cálcio ionóforo.

Nichi (2003), trabalhando com touros, encontrou correlação negativa entre as concentrações plasmática de SOD e a porcentagem de espermatozoides portadores de defeitos primários, indicando que as amostras com maiores concentrações de SOD apresentavam menores porcentagens de defeitos espermáticos ligados à espermatogênese. Este autor também encontrou correlação negativa entre as concentrações de SOD e o percentual de gametas portadores de defeitos na peça intermediária e de microcefalia, sugerindo que as amostras com maiores concentrações de SOD apresentavam menores porcentagens de espermatozoides portadores desses defeitos.

O processo de criopreservação da célula espermática compromete os níveis de SOD, reduzindo a sua concentração ou inibindo a sua atividade (BILODEAU et al., 2000). Em contrapartida, a adição deste antioxidante ao diluidor de congelação de sêmen poderia contribuir na manutenção dos níveis deste antioxidante. Não foi encontrado relatos da adição de SOD isolada em sêmen de bovino.

No entanto, em trabalhos com sêmen ovino fresco, Stefanov et al. (2004) adicionaram três diferentes concentrações de SOD (30, 60 e 120 U/mL) na incubação por até cinco horas, a 39°C, e observaram que as maiores doses de SOD foram mais eficazes, enquanto a dosagem mais baixa não teve efeito ou, se apresentou, foi temporário.

Silva et al. (2011) avaliando cinética através do CASA, integridade das membranas por fluorescência, análise ultraestrutural através da microscopia eletrônica e fertilidade através da superovulação, quando adicionou (25,50 e 100 U/ml de SOD) ou sêmen ovino congelado, observaram que a maior concentração de SOD apresentou melhores resultados.

A catalase (CAT) é uma enzima intracelular encontrada na maioria dos organismos, pertencente à subclasse das enzimas oxidorredutases, que se localiza principalmente nos peroxissomos e mitocôndria das células de mamíferos, e age catalisando a reação (Figura 3) que transforma duas moléculas de H₂O₂ em duas moléculas de água (H₂O) e uma de oxigênio (O₂) (NORDERBERG, 2001).

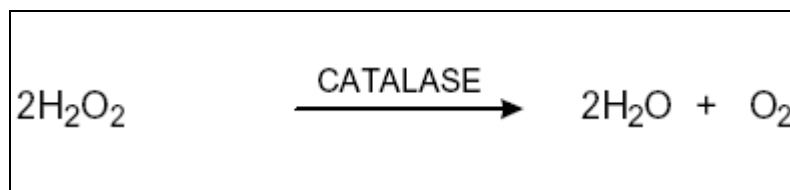


Figura 3. Representação esquemática da reação da Catalase.
(Fonte: SILVEIRA, 2004).

Ao adicionar CAT (100 e 200 U/mL) ao diluente Tris-gema em sêmen ovino Câmara et al. (2011) constataram ação benéfica, ao observarem redução dos efeitos deletérios da refrigeração na motilidade total dos espermatozoides mantidos a 5 °C por 24 h, embora nenhum efeito tenha sido observado na funcionalidade das membranas espermáticas.

Silva et al. (2010) criopreservaram amostras de sêmen ovino em diluente tris-gema-glicerol, adicionado de 50 e 100 U/ml de Catalase, e observaram nos estudos de integridade de acrossoma, cinética e ultraestrutural, que a viabilidade espermática não foi preservada. No entanto, quando adicionaram CAT 25 U/mL + SOD 100 U/mL, os autores obtiveram maior viabilidade espermática. Este resultado pode ser explicado pelo fato da necessidade de SOD nos sistemas biológicos ser quatro vezes superior a de CAT (MAXWELL e STOJANOV, 1996).

Em experimento com caprinos com diferente qualidade espermática, A (inferior) e B (superior), Maia et al. (2011) adicionaram CAT em três concentrações (1, 5 e 10 U/mL), onde observaram que as menores concentrações de CAT (1 e 5U/mL) determinaram maior efeito benéfico na preservação da motilidade espermática nas amostras de sêmen com alto percentual de patologias espermática (Grupo A). Todavia, no Grupo B, estes autores também obtiveram melhora desses parâmetros após a adição de CAT (5U/mL).

Fernández-Santos et al. (2008), trabalhando com touros em diferentes condições experimentais [Controle, CAT 200U/mL, oxidante (OXI) (100µM Fe²⁺ / 1mM de ascorbato) e Catalase + Oxidante (CAT / OXI)], em três tempos de incubação (0, 2 e 6 h) a 37°C em PBS, verificaram que a CAT suprimiu o efeito do oxidante, protegendo os espermatozoides contra espécies reativas de oxigênio e melhorando tanto a motilidade espermática como o *status* da cromatina durante a incubação. Estes autores concluíram que a suplementação com catalase ao meio, após a descongelação, protege os espermatozoides de touro contra o estresse oxidativo e pode ser usada para processamento de espermatozoides descongelados.

A motilidade, concentração e morfologia espermáticas são os parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen (fresco, resfriado ou congelado). Usualmente, a motilidade espermática é estimada em análise do sêmen entre lâmina e lamínula, enquanto as anormalidades espermáticas são avaliadas em esfregaços corados. Ambas as técnicas são realizadas utilizando microscopia óptica. Entretanto, estudos reportam que este tipo de análise manual é impreciso, mesmo quando executada por investigadores experientes, e as análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (ARRUDA et al., 2007).

Com o propósito de obter uma técnica que demonstre maior repetibilidade tanto para motilidade quanto para morfometria, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos. Em tese, programas computadorizados para a avaliação espermática podem ser mais objetivos e imprimir maior repetibilidade às avaliações do que a habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de normalidade espermáticas. O poder de análise deste tipo de teste é dado pela avaliação precisa e acurada dos espermatozoides com alto grau de objetividade, podendo assim aperfeiçoar o processo de avaliação seminal em animais (ARRUDA et al., 2011). Entretanto, até o momento, nenhuma metodologia de avaliação mostrou-se eficiente para este fim, quando utilizada isoladamente, sendo recomendado o emprego conjunto destas técnicas para a melhor predição da capacidade fertilizante dos espermatozoides (SILVA e GUERRA, 2012).

Considerando que, *in vivo*, espermatozoides potencialmente férteis são continuamente submetidos a obstáculos no processo de seleção, antes e durante a fertilização, as informações proporcionadas pelos métodos laboratoriais de avaliação da integridade e da função espermática são de grande importância, por correlacionar os parâmetros de qualidade espermática com os resultados de fertilidade. Consequentemente, estas avaliações podem auxiliar nas aplicações comerciais, como seleção de animais de alto valor genético devido à alta qualidade espermática, visando a sua utilização em biotécnicas reprodutivas, na constituição de bancos de germoplasma, bem como da conservação de material genético de animais em vias de extinção (BATISTA e GUERRA, 2010).

A membrana plasmática envolve completamente o espermatozoide (PESCH e BERGMANN, 2006). A avaliação das membranas espermáticas é um indicador importante do sucesso da criopreservação, uma vez que são extremamente sensíveis às crio-injúrias. As inúmeras funções da membrana citoplasmática estão relacionadas ao metabolismo celular e à manutenção da motilidade, capacitação, reação acrossomal, interações entre o espermatozoide e o epitélio do trato genital da fêmea e interação com oócito (PEÑA et al., 2005).

A integridade de membrana é usualmente avaliada após a exposição dos espermatozoides a corantes impermeáveis à membrana, de maneira que os gametas não corados são considerados vivos. Atualmente muitos corantes usados são fluoróforos que reagem com enzimas citoplasmáticas ou ligam-se ao DNA (SILVA e GADELLA, 2006).

Várias sondas fluorescentes têm sido usadas e validadas para análise da integridade de membrana em espermatozoides (BATISTA e GUERRA, 2010). No entanto, o iodeto de propídio (PI) vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana, seja isoladamente ou em associação (ARRUDA et al., 2007). Segundo este autor uma combinação que tem sido muito utilizada é o IP ao diacetato de carboxifluoresceína (DCF).

O acrossoma é essencial para o funcionamento da célula espermática. Assim, a porcentagem de células com acrossoma intacto e capazes de realizar a reação do acrossoma no devido momento representam uma característica importante do sêmen (KAWAKAMI et al., 1993). A integridade do acrossoma espermático é importante, uma vez que ele inicia a reação físico-química do processo de fertilização (BARTH e OKO, 1989). Podendo ser avaliada por diferentes métodos. No entanto, os mais usados são aqueles que utilizam isotiocianato de fluoresceínas conjugadas a lecitinas, tais como: Peanut Agglutinin (FITC-PNA) ou Pisum Sativum Agglutinin (FITC-PSA) (SILVA e GUERRA, 2012).

Quando é usado o FITC-PNA para a avaliação da integridade do acrossoma, este agente se liga a β -galactose associada à pequena porção da membrana acrossomal externa de espermatozoides portadores de acrossoma intacto (GRAHAM, 2001), corando-os com uma fluorescência verde brilhante (ROTH et al., 1998), sendo utilizado em espermatozoides caprinos (SOARES et al., 2011; VIDAL et al., 2013), ovinos (CÂMARA et al., 2011; SILVA et al., 2013) e equinos (SILVA et al., 2009; BARROS et al., 2013).

No entanto, o FITC-PSA entra em contato com o conteúdo acrossomal e se liga a α -manose e a α -galactose da matriz acrossomal, corando esta região (GRAHAM, 2001) e

marcando com sucesso o acrossomo espermático na cor verde amarelado (ARRUDA et al., 2007), o que facilita a visualização e a identificação dos acrossomos lesados, sendo utilizado em espermatozoides bovinos (FORERO-GONZALEZ et al., 2012) e equinos (ARRUDA et al., 2007).

Alterações no funcionamento da mitocôndria pode ser um fator relacionado à infertilidade. Esta organela celular é importante para a manutenção energética da motilidade espermática, um dos maiores determinantes da fertilidade do macho (RUIZ-PESINI et al., 1998), e produzem energia em forma de adenosina trifosfato (ATP), a qual é quebrada em moléculas de adenosina trifosfatase, liberando a energia necessária para a movimentação da cauda (BARTH e OKO, 1989).

A mitocôndria provê a maior parte do ATP necessário ao metabolismo total do espermatozoide, incluindo aquele necessário à motilidade. Diferentes sondas fluorescentes têm sido utilizadas para avaliar a função mitocondrial espermática. Estas sondas são ativamente transportadas nas mitocôndrias que possuem respiração ativa. Portanto, quanto mais ativa a respiração mitocondrial, mais corante é acumulado nesta organela (GRAHAN e MOCÉ, 2005).

A sonda de iodeto de 5, 5', 6, 6' - tetracloro - 1, 1, 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) tem sido utilizada para coloração diferencial de mitocôndrias com alto ou baixo potencial de membrana (GRAVANCE et al., 2000). Por ser dependente do gradiente eletroquímico, este corante necessita de potencial de membrana mitocondrial altamente negativo para penetrar na organela e emitir fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha ou verde, de acordo com sua concentração interna final (ARRUDA et al., 2007). Quando encontrado em baixas concentrações, permanece no seu estado monomérico e fluoresce em verde. Entretanto, em elevadas concentrações, o JC-1 forma agregados que fluorescem em laranja (ARRUDA et al., 2011). Essa técnica tem sido utilizada em espermatozoides bovino, equino (SILVA et al., 2009; BARROS et al., 2013), caprino (SOARES et al., 2011; VIDAL et al., 2013) e ovino (CÂMARA et al., 2011; SILVA et al., 2013).

Limitações devem ser consideradas para o uso de sondas fluorescentes. Uma delas é a necessidade de equipamentos de custo mais alto, como um microscópio de epifluorescência ou um citômetro de fluxo. Entretanto, deve-se destacar a praticidade de execução desta técnica e a facilidade de treinamento de pessoal para a leitura (ARRUDA et al., 2011).

Os testes de IA ou FIV representam as técnicas de maior sensibilidade para o acesso ao potencial de fertilização das amostras seminais, no entanto o custo elevado e a necessidade de maior consumo de tempo das avaliações (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005) prejudicam a adoção de tais métodos na rotina da análise do sêmen bovino. Por essa razão, diversos estudos têm sido conduzidos no sentido de se estabelecer a correlação de cada teste laboratorial ou suas associações com os índices de fertilidade *in vivo*, buscando-se, dessa maneira, predizer o potencial de fertilidade agregado às amostras seminais (PAPA et al., 2008b).

A avaliação subjetiva da motilidade espermática pós-descongelamento é um parâmetro usado para determinar a qualidade do sêmen de touros destinados à IA. Assim, Correa et al. (1997) observaram correlação positiva ($r = 0,53$; $P < 0,01$) entre a motilidade pós-descongelamento e a fertilidade, com diferença significativa entre touros de baixa ($r = 0,39$; $P < 0,01$) e alta ($r = 0,61$; $P < 0,01$) fertilidade, indicando que essa diferença se deve às variações na qualidade dos espermatozoides. Para uma maior objetividade na avaliação da motilidade espermática pós-descongelamento, estudos tem se concentrado no uso de análise computadorizada de espermatozoides (CASA) (MORTIMER, 2000).

O grande desafio para se trabalhar com o sistema CASA é padronizar os procedimentos laboratoriais adotados para a análise objetiva do sêmen. Manter a concentração espermática (25 a 50×10^6 espermatozoides/mL) no momento da avaliação é uma tarefa difícil, principalmente para algumas amostras do sêmen *in natura*. A diluição da amostra com meios que não interfiram nas avaliações, causando diminuição da motilidade (tampão fosfato PBS, meio Talp e outros), por depressão do sistema gerador de ATP da célula, ou por formação de debris, como, por exemplo, uso de diluentes contendo gema de ovo. Quando existem partículas no diluente com o tamanho da cabeça dos espermatozoides, o sistema reconhece como uma célula imóvel, alterando, com isso, o resultado da motilidade espermática (ARRUDA et al., 2011).

Estes sistemas oferecem informações sobre a cinética espermática, com a utilização de campos de vídeo contendo imagens de espermatozoides eletronicamente digitalizados, bem como a determinação da posição central de cada cabeça espermática (BATISTA e GUERRA, 2010). Os parâmetros analisados pelo CASA são motilidade espermática total (MT, %), motilidade espermática progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), retilinearidade (STR,

%), linearidade (LIN, %), índice de oscilação ou wobble (WOB, %), amplitude lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento de cauda (BCF, Hz) (MORTIMER, 2000).

Apesar da grande controvérsia existente a respeito da correlação dos padrões de movimento espermático com os índices de fertilidade *in vivo*, são observadas diferenças significativas no padrão de movimento entre espermatozoides que alcançam altas e baixas taxas de fertilização (VERSTEGEN et al., 2002). Algumas variáveis geradas pelo sistema CASA, como a linearidade espermática, parecem apresentar uma maior correlação com fertilidade (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005). Ainda, a associação de múltiplas variáveis de movimento geradas pela técnica CASA demonstra uma maior correlação com fertilidade *in vivo*, em relação à utilização de apenas um atributo de movimento (FARREL et al., 1996).

A avaliação da fertilidade é essencial para a IA, podendo ser realizada com testes a campo ou em laboratório utilizando a FIV (LARSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000). O uso da IA para avaliação da fertilidade de touro consiste no método mais preciso, porém, quando comparado a FIV, se revela mais demorada e onerosa (HALLAP, 2005).

A FIV consiste em uma excelente ferramenta de pesquisa para investigar as características de espermatozoides com morfologia anormal quanto à fecundação e desenvolvimento embrionário. A produção de embriões *in vitro* permite repetidas e diretas observações das interações espermatozoide-oócito (THUNDATHIL, 2001).

Os testes laboratoriais têm tido grande utilidade para excluir, dos programas reprodutivos, touros de baixo potencial fecundante, mas, até o momento, não fornecem subsídios para apontar, dentre os férteis, quais os mais aptos a proporcionar as maiores taxas de prenhez. Uma grande variedade de técnicas encontra-se disponível para avaliação dos espermatozoides e elas podem ser usadas separadamente ou em associação, buscando-se sempre aquelas com alta correlação com a fertilidade *in vivo*. Portanto, a ampla variação observada entre resultados se deve a inúmeros fatores, e a aplicabilidade da seleção *in vitro* das doses de sêmen, como certificação de seu bom desempenho a campo permanece como um objetivo a ser atingido (ARRUDA et al., 2010).

A recuperação de espermatozoides obtidos do epidídimo de bovinos é uma tecnologia perfeitamente aplicável na preservação de germoplasma de animais de valor genético, podendo ser uma ferramenta importantíssima na reprodução assistida. Todavia, ainda são necessários muitos estudos relacionados à viabilidade dessas células, como estudos da avaliação da capacidade de fertilização de oócitos *in vivo* e *in vitro* e dos

benefícios da adição de antioxidantes ao fluido epididimário, com o objetivo de se obter um maior aproveitamento do material genético.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, R.A.; SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction**, Update, v. 9, p. 331-345, 2003.

AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, p. 497-506, 2001.

ALMEIDA, F.C.; GOMES, W.A.; SOUZA, H. M.; BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Effect of stabilization time on cryopreservation of spermatozoa obtained from bull epididymis. **Animal Reproduction**. v. 9, p. 959, 2012.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. **Biology of Reproduction**, v. 28, p.1129-1130, 1983.

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

AMANN, R.P.; JOHNSON, L.; THOMPSON, D.L.; PICKETT, B.W. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 586-592, 1976.

AMANN, R.P. **Reproductive physiology and endocrinology of the dog**. In: Morrow D.A. current therapy in theriogenology. 2.ed. Philadelphia: WB Saunders, 1986. 1143p.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H.; VEERAMACHANENI, D.N. The epididymis and sperm maturation: a perspective. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 361-381, 1993.

AMANN, R.P. The vital role of the epididymis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.213-221, 1995.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.8-16, 2007.

ARRUDA, R.L; ORROS, I.R.; PASSOS, T.S.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCARI, C.E.S.N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.168-184, 2010.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.

BARROS, L.O.; Silva, S.V.; ALMEIDA, F.C.; SILVA, E.C.B.; Guerra, M.M.P. Efeito da adição de glutathione peroxidase e cisteína ao diluidor de congelamento do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2013. (No prelo)

BARTELS, P.; LUBBE, K.; KILIAN, I.; FRIEDMANN Y, V.D.G.; MORTIMER, D. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen-thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. **Theriogenology**, v.53, p.325, 2000.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.

BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.125-132, 2010.

BEORLEGUI, N.; CETICA, P.; TRINCHEIRO, G.; CÓRDOBA, M.; BECONI, M. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. **Andrologia**, v. 29, p. 37-42, 1997.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defense are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

BROOKS, D.E. Epididymal functions and their hormonal regulation. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 36, p. 205-221, 1983.

BRUEMMER, J.E.; REGER, H.; ZIBINSKI, G.; SQUIRES, E.L. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, p. 405-407, 2002.

- CÂMARA, D.R.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J. F.; GUERRA, M. M. P. Effect of the addition of antioxidants and different pre-freezing equilibration times on the quality of frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v. 76, p. 342 - 350, 2011.
- CAMPBELL, M.K.; FARREL, S.O., **Lipídeos e proteínas estão associados a membranas biológicas**. In: Campbell, M.K., Farrel, S.O. (Eds.), *Bioquímica*. 5 edição. Thomson Learning, São Paulo, 2007. 202p.
- CARY, J.A.; MADILL, S.; FARNSWORTH, K.; HAYNA, J.T.; DUOOS, L.; FAHNING, M.L. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 45, n. 1, p. 35-41, 2004.
- CARR, D.W.; ACOTT, T.S. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Studies of a sperm motility quiescence factor. **Biology of Reproduction**, v. 30, p. 913-925, 1984.
- CASCIERI, M.; AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. Adenine nucleotide changes at initiation of bull sperm motility. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 787-793, 1976.
- CORREA, J.R; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination programs. **Theriogenology**, v. 48, p. 721-731, 1997.
- COSTA, P.M.; MARTINS, C.F.; FRANCO, V.O.; REZENDE, L.O.F.; SERENO, J.R.B.; CAMPOS, H.C.F. Nascimento de bezerros normais após inseminação artificial utilizando espermatozoides criopreservados obtidos de epidídimos refrigerados de bovinos após a morte. **Ciência Rural**, v. 41, n.5, p. 869-874, 2011.
- CRABO, B.G.; HUNTER, A.G. **Sperm maturation and epididimal function**. In: SCIARRA, J.J.; MARKLAND, C.; SPEIDEL, J. *Control of male fertility*. Hagerstown, PA: Harper & Row, 1975. 316p.
- DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.
- De LEEUW, F.E.; De LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H. 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.
- De PAUW, I. **Bovine semen preservation under epididymal conditions and assesment of sperm quality by means of a sperm-oviduct binding assay**. 2003. 201p. Tese (Doutorado em Diergeneeskundine Wetenschappen). Universiteit Gent, Gante, 2003.

- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 47, p. 243-255, 1993.
- FARREL, P.B.; FOOTE, R.N.; MCARDLE, M.M.; TROUERN-TREND, V.L.; ARDIF, A.L. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Andrology**, v.17, p.293-300, 1996.
- FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C.; GARDE, J. J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. **International Journal of Andrology**, 32, 353–359, 2008.
- FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATIAS, D.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C.; MONTORO, V.; GARDE, J. J. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 93–104, 2009.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p. 13-23, 2002.
- FORERO-GONZALEZ, R.A.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; BRESSAN, F.F. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Andrologia**, v. 44, p. 154-159, 2012.
- GARDE, J.; AGUADO, M.; PEREZ, S.; GARRIDO, D.; PEREZ-GUZMAN, M.; MONTORO, V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 2003, 1994.
- GOOVAERTS I.G.F.; HOFACK G.G.; VAN SOOM A.; DEWULF J.; NICHI M.; KRUIF A.; BOLS P.E.J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two cauda e epididymides of the same Bull. **Theriogenology**, v. 66, p. 323-330, 2006.
- GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247, 2001.

- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.
- GRANEMANN, L.C. **Avaliação comparativa do sêmen eqüino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia**. 2006. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária. UFPR; Curitiba, 2006.
- GRAVANCE, C.V.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, p. 1691-1703, 2000.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidante e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.
- HALLAP, T. **Assessment of sperm attributes of frozen-thawed AI doses from Swedish and Estonian dairy bulls sires**. 2005. 35p. Tese de doutorado (Divison of comparative Reproduction, Obstetrics and Udder Health) – Department of Clinical Sciences - Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 2005.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3ed. New York: **Oxford University Press**, 1999. 936 p.
- HAMAMAH, S.; GATTI, J.L. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. **Human Reproduction**, v. 13, s. 4, p. 20-30, 1998.
- HEISE, A.; AHN, W.K.; VOLKMANN, D.H.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 48-53, 2010.
- HERRERA, C.; MIRAGAYA, H.M.; CONDE, P.; HYNES, V.; LOSINNO, L.; QUINTANS, C.; PASQUALINI, R.S. Intracytoplasmic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 299-302, 2006.
- HIIPAKKA, R.A.; HAMMERSTEDT, R.H. Changes in 2-deoxyglucose transport during epididymal maturation of ram sperm. **Biology of Reproduction**, v. 19, p. 1030-1035, 1978.
- HINGST, O.; BLOTTNER, S.; FRANZ, C. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue staining and acridine orange staining. **Andrologia**, v. 27, p. 275-279, 1995.

- HISHINUMA, M.; SUZUKI, K.; SEKINE, J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. **Theriogenology**, v. 59, p. 813-820, 2003.
- HOLMES, R.P.; GOODMAN, H.O.; SHIHABI, Z.K.; JAROW, J.P. The taurine and hypotaurine content of human semen. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 289–292, 1992.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.
- HOSKINS, D.D.; BRANDT, H.; ACOTT, T.S. Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. **Federation Proceedings**, v. 37, p. 2534-2542, 1978.
- JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R.J. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v. 31, p. 531-537, 1979.
- KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v. 60, p.1249–1259, 2003.
- KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; OVERSTREET, J.W. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. **Biology of Reproduction**. v. 48, p.841-845, 1993.
- KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKI, N., Cryopreservation and ensuing “in vitro” fertilization ability of boar spermatozoa from epididymis stored at 4°C. **Theriogenology**, v. 50, p. 615-633, 1998.
- KISHIKAWA, H.; TATENO, H.; YANAGIMACHI, R. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4 °C. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, p. 217–222, 1999.
- KOZIOROWSKA-GILUN, M.; KOZIOROWSKI, M.; FRASER, L.; STRZEŻEK, J. Antioxidant Defence System of Boar Cauda Epididymidal Spermatozoa and Reproductive Tract Fluids. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 527-533, 2011.
- LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 327-336, 2000.
- LUSIGNAN, M.; BERGERON, A.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. The Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Interact with Caseins and Whey Proteins of Milk Extender. **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 457–464, 2011.

- MAIA, M.S.; MEDEIROS, I.M.; SILVA, J.V.C. Associação entre patologia espermática e perda da motilidade do espermatozoide caprino congelado na presença de Catalase, In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 5, 2011, **Anais...**, João Pessoa : EMEPA, 2011. (CD-ROM).
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1250–1258, 2002.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen**. Berlin: Springer-verlag, 1981. 495p.
- MATÉS, J.M. Effects of antioxidant enzymes in molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.
- MARTINS, C.F.; SILVA, A.E.D.F.; MATARAZZO, Evaluation of the quality of cryopreserved bovine epididymal spermatozoa by analysis of motility, acrosomal status, penetration ability in oocytes and integrity of sperm chromatin. **Biology of Reproduction**, v. 62, Supl. 1, p. 156, 2000.
- MARTINS,C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 326–331, 2007.
- MARTINEZ-PASTOR, F.; GUERRA, C.; KAABI, M.; DIAZ, A.R.; ANEL, E.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. **Theriogenology**, v. 60, n. 1, p. 24-40, 2005
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia. **Anais:Palestra**. Goiânia: Goiás, 2005.
- MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, n. 8, p. 1013-1020, 1996.
- MELO, C.M.; PAPA, F.O.; FIORATTI, E.G.; VILLAVERDE, A.I.S.B.; AVANZI, B.R.; MONTEIRO, G.; DELL'AQUA JR. J.A.; PASQUINI, D.F.; ALVARENGA, M.A. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 331, 2008.
- MILLER, J.G.O.; SHULTZ, G.A. Amino acids content of preimplantation embryos and fluids of the reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v. 36, p. 125–129. 1987.

- MONTEIRO, G.A.; GUASTI, P.N.; MELO, C.M.; DELLAQUA JR. J.A.; MARTIN, J.C.; CARNEIRO, R.; PAPA, F.O. Comparison between cooled sperm from ejaculate and epididymal cauda In: In: CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION - WEVA, 11., Guarujá. **Proceedings...** Guarujá, 2009, 1 CDRoom.
- MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O.; GUASTI, P. N.; FREITAS, N.P.P.; MELO, C. M.; AVANZI, B.R.; DELLAQUA JUNIOR, J. A. . Fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subférteis. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, p. 255-263, 2011.
- MOORE, H.D.M.; HARTMAN, T.D.; PRYOR, J.P. Development of the oocyte penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis. **International Journal of Andrology**, v. 6, p. 310-318, 1983
- MOORE, I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2372-2381, 2005.
- MORRIS, L.; TIPLADY, C.; ALLEN, W.R. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. **Theriogenology**, v. 58, p. 643-646, 2002.
- MORTIMER, S.T. CASA-practical aspects. **Journal of Andrology**, v.21, p.515-524, 2000.
- MOUSTAFA, M.H.; SHARMA, R.K.; THORNTON, J. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. **Human Reproduction**, v. 19, n. 1, p. 129-138, 2004.
- MURADÁS, P.R.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; GRANEMANN, L.C.; SANTOS, I.W.; PIMPÃO, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 69-74, 2006.
- NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados**. 2003. 103p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, USP, São Paulo, 2003.
- NOILES, E.E.; BAILEY, J.L.; STOREY, B.T. Temperature dependence of the water permeability, Lp, of murine sperm shows a discontinuity between 4° and 0°C. **Cryobiology**, v. 32, p. 220-238, 1995.

- NORDERBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.
- ORTEGA, A.M.; IZQUIERDO, A.C.; GÓMEZ, J.J.H. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. **Interciencia**, v. 28, n. 12, p. 699-704, 2003.
- PAPA, F.O.; MELO, C.M.; FIORATTI E.G.; DELLA'QUA, J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 293-301, 2008a.
- PAPA, F.O.; CRESPILO, A.M.; FREITAS DELL'AQUA, C.P.; DELL'AQUA JR, J.A. Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, Londrina. **Anais...** p. 78-94, 2008b.
- PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A.; WALGREN, M.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**. v.28, p.107-114, 2005.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**. v.37, p.597-612, 2006.
- PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A. A yolk-buffer pabulum for the cryopreservation of bull semen. **Journal Dairy Science**, v. 23, p. 399-404, 1940.
- PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 1ed.: Lea e Febiger, Philadelphia. 1993. p. 769-789.
- PUJOL, A.; BAYARD, F.; LOUVET, J.P.; BOULARD, C. Testosterone and dihydrotestosterone concentrations in plasma, epididymal tissues and seminal fluid of adult rats. **Endocrinology**, v. 98, p. 111-113, 1976.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, J.L.; BUSH, L.M.; WILDT, D.E.; BUSH, M. Heterologous *in vitro* fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, v.58, p.475-482, 1998.

- RUIZ-PESINI, E.; DIEZ, C.; LAPEÑA, C.; PEREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J.; ALVAREZ, E.; ARENAS, J.; LOPEZ-PEREZ, M.J. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**, v.44, p.1616-1620, 1998.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A.; NELSON, D.R. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 313-318, 2002.
- SIKKA, S.C.; GREEN, A.G.; CHAUHAN, V. Proteoliposomes interaction with human erythrocyte membranes-functional implantation of gamma glutamyl transpeptidase. **Biochemistry**, v. 21, p. 2356-2366, 1982.
- SILVA, A.E.D.F.; DIAS, A.L.; UNANIAN, M.M.; FREITAS, A.R.; BLOCH, C.J. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1890-1900, 2003.
- SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 11, p. 162-169, 2012.
- SILVA, K.M.G.; MORAES, T.A.P.; SILVA, E.C.B.; GAMBOS, S.C.; GUERRA, M.M.P. Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides equinos após descongelação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 42-49, 2009.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.
- SILVA, S.V. **Avaliação de espermatozoides ovinos criopreservados em Tris-gema acrescido de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos**. 2010. 118p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária. UFRPE, Recife, 2010.
- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 874-881, 2011.
- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, 2013. (No Prelo)

- SILVEIRA, L.R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 812-822, 2004.
- SOARES, A.T.; SILVA, S. V.; ALMEIDA, F.C.; LEMOS, P.F.B.A.; NUNES, J.F.; PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P. Espermatozoides caprinos criopreservados em meio à base de leite desnatado acrescido de glutatona reduzida. **Ciência Rural**, v. 41, p. 1991-1997, 2011.
- STEFANOV, R.; ANGELOVA, M.; STEFANOVA, T.; SUBEV, M.; DOLASHKA, P.; VOELTER, W.; ZACHARIEV, Z. 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. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 203-214, 1997.
- TAJIK, P.; ARMAN, A.; TAKTAZ, T. Bovine Epididymal Sperm Morphology Obtained from Caput, Corpus and Cauda Epididymides. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 22, p. 3936-3939, 2007.
- TAJIK, P.; HASSAN-NEJAD LAMSOO, M. R. Assessment of epididymal sperm obtained from dromedary camel. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 9, n. 1, 2008.
- THUNDATHIL, J.; PALASZ, A.T.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. The use of *in vitro* fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. **Journal of Animal Reproduction Science**. v. 65, p. 181–192, 2001.
- TIPLADY, C.A.; MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. **Theriogenology**, v. 58, n. 2, p. 225-228, 2002.
- TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C.A.; ARNAUDÍN, E.; STORNELLI, M.C.; STORNELLI, M.A.; DE LA SOTA, R.L. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v. 66, n. 6, p. 1637-40, 2006.
- TURNER, T. T.; REICH, G. W. Cauda Epididymidal Sperm Motility: A Comparison Among Five Species. **Biology of Reproduction**, v.32, p. 120-128, 1985.
- VARRICCHIO, E.; LANGELLA, M.; MAHARAIAN, V.; PAINO, G. Structure and function of mammalian epididymis. **Acta Medica Veterinaria**, v. 42, p. 221-234, 1996.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

VIDAL, A.H.; BATISTA, A.M.; SILVA, E.C.B.; GOMES, W.A.; PELINCA, M.A.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 109, p. 47-51, 2013.

YU, I.; LEIBO, S.P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. **Theriogenology**, v. 57, p, 1179-1190, 2002.

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

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

5 Experimentos

5.1 Avaliação de diferentes concentrações de glicerol e tempos de estabilização na criopreservação de espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo de touros Nelore

Felipe Costa Almeida¹, Wilton Arruda Gomes¹, Sildivane Valcácia Silva¹,
Helder Melo de Souza¹, Gustavo Ferrer Carneiro², Pierre Soares Castro³,
Maria Madalena Pessoa Guerra¹

¹Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Depto de Medicina Veterinária, UFRPE – Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Recife- PE. CEP: 52.900-171. ²Laboratório de Reprodução Animal, UFRPE – Campus UAG, Garanhuns- PE. ³Laboratório de Doenças Metabólicas e Nutricionais de Ruminantes, Depto de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife- PE.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar os parâmetros espermáticos dos gametas masculinos obtidos da cauda do epidídimo de touros da raça Nelore, sob diferentes concentrações de glicerol e tempos de estabilização a 5°C. Os epidídimos foram obtidos em matadouro, colocados em sacos individuais e transportado em caixa térmica em temperatura ambiente (28 °C). No laboratório, os espermatozoides foram recuperados pela técnica de flutuação, utilizando 5,0 mL de Solução Tris, diluídos em Tris-gema e diferentes concentrações de glicerol (3, 5 e 7%), na concentração de 60×10^6 espermatozoides/mL, acondicionados em palhetas (0,25 mL), submetidos a diferentes tempos de estabilização (0, 2 e 4h) e congelados em máquina. Após descongelação (37 °C/ 30 segundos), as amostras foram avaliadas quanto à integridade de membrana plasmática (iMP), acrossomal (iAc), potencial de membrana mitocondrial (PMM) e cinética espermática. Após avaliações *in vitro*, as amostras que obtiveram melhores resultados, quanto a concentração de glicerol e tempo de estabilização, foram submetidas ao teste FIV. Na avaliação do tratamento, as análises de iMP e iAc apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) para o glicerol 3%, no tempo de 4h, o qual não foi eficaz para preservação das membranas plasmática e acrossomal. Na avaliação da cinética espermática, foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros BCF, com os tratamentos glicerol 3% e 7 % no tempo de 2h apresentando valores inferior ($P < 0,05$) ao do glicerol 5%, e ALH, com o tratamento glicerol 3% no tempo de 4h apresentou menor valor ($P < 0,05$) em relação aos demais grupos. Na avaliação de tempo, as análise de aPMM e iAc apresentaram diferenças significativas com o tempo de 0h no tratamento de glicerol 5% mostrando-se inferior ($P < 0,05$) aos demais. Para a FIV foi utilizado o tratamento glicerol 5% e o tempo de estabilização de 4h, com produção de viabilidade embrionária de 40 % nos oócitos utilizados. Com base nos resultados de integridades das membranas, cinética e fertilização *in vitro*, é possível concluir que a criopreservação de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros deve ser realizada utilizando meio de diluição acrescido de glicerol na concentração de 5% e tempo de estabilização a 5 °C de 4h. Todavia, ressalta-se que espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros podem ser utilizados com sucesso em programas de FIV.

Palavras-chave: Espermatozoides, glicerol, tempo de estabilização, fertilização *in vitro*.

ABSTRACT

This work aimed to study sperm parameters of male gametes obtained from epididymis tail of Nelore bulls under different concentrations of glycerol and stabilization times at 5 °C. Epididymis were obtained from slaughterhouse up to one hour after the animal's death, placed in individual bags and transported in box at room temperature (28 °C). In laboratory, spermatozoa were recovered from epididymis tail by flotation technique in approximately 5.0 mL of Tris, following diluted in Tris-yolk egg at different concentrations of glycerol (3%, 5%, and 7%) at a concentration of 60×10^6 spermatozoa/mL, packaged in straws (0.25 mL), at different stabilization times (0h, 2h and 4 h) and frozen in automated system. After thawing (37 °C/30 s), samples were evaluated for plasma membrane integrity (PMi), acrosome integrity (Aci), mitochondrial membrane potential (MMP) and sperm kinematics (CASA). After *in vitro* evaluations, the better samples regarding glycerol concentration and stabilization time were fertilizing ability test by IVF technique. Significant difference ($P > 0.05$) was observed for PMi and Aci analysis for the 3% glycerol, at time 4h, which was not effective for preservation of plasma and acrosomal membranes. In evaluation of sperm kinematics there were significant differences in the parameters BCF, with treatments 3% and 7% glycerol in the time of 2h with values lower ($P < 0.05$) from 5% glycerol, and ALH, treatment with 3% glycerol at time 4h showed lowest ($P < 0.05$) compared to other groups. Significant differences was observed for Aci and MMP analysis to stabilization time at 0h to 5% glycerol group, shown lower ($P < 0.05$) than the other groups. After evaluation, only glycerol 5% for 4h was used for IVF treatment, with production of 40% embryonic viability in oocytes used. Based on the results of membrane integrity, kinematic and *in vitro* fertilization, it is possible to conclude that spermatozoa cryopreservation obtained from epididymis tail of bulls should be performed using dilution medium supplemented with 5% glycerol concentration and stabilization time to 5 °C for 4h. However, it is noteworthy that sperm obtained from epididymis tail of bulls can be successfully used in IVF programs.

Keywords: Spermatozoa, glycerol, stabilization time, *in vitro* fertilization

Introdução

A morte inesperada, os processos obstrutivos ou os distúrbios traumáticos podem interromper prematuramente a vida reprodutiva de touros de alto valor genético. Nesses casos, novas formas de colheita de espermatozoides têm sido estudadas com o objetivo de preservar a genética valiosa destes animais. Somente nos últimos anos, alguns pesquisadores intensificaram o estudo da recuperação e preservação de espermatozoides viáveis obtidos da cauda do epidídimo (TIPLADY et al., 2002; HEROLD et al., 2006; HERRERA et al., 2006; PAPA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009; ALMEIDA et al., 2012). Isto ocorreu devido ao crescente interesse pela preservação de espécies ameaçadas de extinção e de células espermáticas obtidas de animais de produção, impossibilitados de realizar cobertura ou colheita de sêmen com vagina artificial (GOOVAERTS et al., 2006).

A recuperação e a criopreservação de espermatozoides do epidídimo de animais mortos (recuperação pós-morte) é uma opção viável para preservar gametas masculinos e, dessa forma, manter um banco de germoplasma (TITTARELLI et al., 2006). Os procedimentos de isolamento de espermatozoides do epidídimo de animais mortos, a criopreservação e subsequente utilização para a fecundação *in vitro* são importantes ferramentas para resgatar o material genético que poderia ser perdido, tanto de animais de produção quanto de espécies em extinção (MARTINS et al., 2007).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado na congelação de sêmen bovino. Sua concentração ótima seria aquela em que há uma predominância de seus efeitos protetores sobre os efeitos tóxicos. Essa concentração pode ser influenciada por outros componentes do diluente, pelo padrão de resfriamento, assim como pelos métodos de congelação e descongelação (LEMMA, 2011). Contudo, o fator determinante está relacionado com a espécie, embora seu efeito tóxico sobre os espermatozoides seja observado em elevadas concentrações, levando à perda da capacidade de fertilização (HOLT, 2000).

Protocolos para criopreservação sêmen de touro geralmente incluem congelação lenta até a temperatura de 4 a 5 °C, seguido de um intervalo variável de tempo de estabilização (de 30 min a 24h) a esta temperatura, antes da congelação. Há discordância quanto à necessidade e duração do tempo de equilíbrio sobre a criopreservação do sêmen e do seu efeito sobre a viabilidade de espermatozoides (LEITE et al., 2010). Além disso, existe um desejo de reduzir ou eliminar este processo, acelerando a criopreservação sem comprometer a qualidade espermática no período pós-descongelação (DHAMI et al., 1992; DHAMI e SAHNI, 1993).

Sabe-se que os espermatozoides da cauda do epidídimo são mais resistentes, uma vez que não entram em contato com as proteínas do plasma seminal bovino (BSP), que remove os lipídios, particularmente colesterol, resultando na desestabilização da membrana plasmática (MANJUNATH et al., 2002). Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de glicerol (3, 5 e 7%) e tempos de estabilização (0, 2 e 4h) no processo de criopreservação de espermatozoides bovinos obtidos da cauda do epidídimo.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados 80 testículos obtidos de touros da raça Nelore, com idade variando de 36 a 60 meses, pesando entre 500 e 600 Kg, em matadouros da Zona da Mata do Estado de Pernambuco, até uma hora após a morte do animal, acondicionados em sacos plásticos identificados, e transportados em caixa térmica em temperatura ambiente (28 °C) ao Laboratório de Andrologia da UFRPE.

Recuperação dos espermatozoides

No laboratório, os epidídimos foram isolados e higienizados em álcool 70% (MARTINS, 2007). Os espermatozoides foram recuperados da cauda do epidídimo pela técnica de flutuação (ALMEIDA et al., 2012), por 10 minutos, em placa de Petri contendo 5 mL de solução Tris (3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose; 100 mL de água bidestilada; pH 7,0) aquecido a 37 °C.

Seleção dos espermatozoides epididimários

As amostras obtidas de cada epidídimo foram avaliadas individualmente quanto a motilidade subjetiva (utilizando 10 µL de cada amostra, colocada entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37 °C). As amostras que apresentavam mais de 50% de motilidade foram utilizadas no experimento, seguindo as recomendações de Silva et al. (2003).

Congelação do sêmen

Para congelação, foram formados *pools* (n=8) contendo espermatozoides de cinco epidídimos, previamente aprovados, e submetidos à análise de concentração espermática, com diluição de 1:200 em formol salino (Câmara de Neubauer; MIES FILHO, 1987). Em seguida, os *pools* foram diluídos em solução de Tris-gema (3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose; 100 mL de água bidestilada; 20% gema de ovo; pH 7,0), acrescido de glicerol nas concentrações de 3, 5 e 7%, e acondicionados em palhetas (0,25 mL) na concentração final de 80×10^6 espermatozoides/mL. Para congelação foram utilizados os tempos de estabilização de 0, 2 e 4h a 5 °C, utilizando a curva lenta do método

automatizado (TK-3000®, TK Tecnologia em congelação LTDA, Uberaba, Brasil). Após o término das congelações, as doses foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Analises pós-descongelção

Após descongelção, alíquotas de sêmen de cada grupo experimental foram submetidas às análises de avaliação de integridade espermática em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), cinética em sistema computadorizado (SCA® Microptic, Barcelona, Spain) e teste de fertilidade pelo método de fertilização *in vitro* (FIV).

Para análise da integridade espermática por sondas fluorescentes, avaliou-se a integridade da membrana plasmática (iMP) pelo método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e Iodeto de Propídio (IP), segundo SILVA et al. (2011). Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em aumento de 400x, usando filtro de emissão DBP 580-630nm e excitação DBP 485/20nm, e classificados como membrana intacta, quando corados em verde ou membrana danificada quando corados em vermelho.

Para análise de integridade do acrossoma (iAc), usou-se Isocianato de Fluoresceína conjugado a Peanut Agglutinin (FITC-PNA; SILVA et al., 2013). Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. Os gametas foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentaram a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou acrossoma reagido, quando apresentavam uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda a cabeça.

Para análise de potencial da membrana mitocondrial (PMM), utilizou-se Fluorocromo Catiônico Lipofílico JC-1 (CÂMARA et al., 2011), sendo avaliados 200 espermatozoides com aumento de 400x usando filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas com alto PMM, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo PMM.

Para análise da cinética espermática, utilizou-se 10 µL da amostra de sêmen (37 °C), examinada em microscópio de contraste de fase (100x) acoplado ao sistema CASA, no qual se observaram os parâmetros de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL, µm s⁻¹), velocidade em linha reta (VSL, µm s⁻¹),

velocidade média do trajeto (VAP, $\mu\text{m s}^{-1}$), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), oscilação (WOB, %), amplitude de deslocamento da cabeça (ALH, μm) e frequência do batimento de flagelo (BCF, Hz), segundo VERSTEGEN et al. (2002).

Para avaliar a fertilidade do sêmen foi utilizada a FIV, com a utilização de oócitos obtidos em matadouros. Os complexos cumulus oócitos (CCO) bovinos foram maturados *in vitro* por 24h em placas de Petri contendo sete poços, em meio TCM-199 suplementado com 10% de soro de égua em estro (SEE), 0,025 mg/mL de piruvato de sódio, 2,2 mg/mL de NaHCO_3 , 0,01 UI de rFSH-h/mL, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de LHb, submerso em óleo mineral, em atmosfera com 5% de CO_2 a 39 °C. Para fecundação, o sêmen foi selecionado em gradiente de Percoll, capacitado com heparina, hiperativado com PHE e utilizado na concentração final ajustada para 1×10^6 spz/mL.

Após o período de maturação, os CCO foram fecundados por 18-20h em 400 μL de meio Fert-Talp com 5% de CO_2 em ar, a 39 °C. Os presumíveis zigotos foram lavados em meio de cultura de embrião e transferidos para a cultura de gotas. A cultura de embriões ocorreu em ácido SOF, suplementado com 2.77 mM de mio-inositol e FCS a 5%, numa atmosfera umidificada de 5% de CO_2 em ar a 39 °C. Os embriões foram avaliados no segundo dia pós-inseminação quanto análise do percentual de estruturas clivadas e no oitavo dia para análise da taxa de blastocisto.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F) com medidas repetidas no tempo, e, nos casos de significância no teste F, as médias foram comparadas pela diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de Student-Newman-Keuls. Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2009). Para todas as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível de significância (p) de 5%.

Resultado e discussão

Nas avaliações para tratamento foi encontrada diferença significativa ($P < 0,05$) para iMP e iAc, onde foi observado que o tratamento glicerol 3% no tempo de 4h não foi eficiente na proteção das membranas (Tabela 1). No estudo da cinética foi observado que o BCF apresentou valores inferiores ($P < 0,05$) para o tempo 2h nos tratamentos 3 e 7% em

relação ao outro tratamento (Tabela 2). Para todos os outros parâmetros de cinética (MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB e ALH) não foram encontradas diferenças significativas ($P>0,05$). No entanto, os tratamentos de 5% e 7% de glicerol obtiveram valores numericamente superiores aos do glicerol 3%.

Quando avaliado o tempo de estabilização, não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) para iMP. No entanto, observou-se que o tempo 0h no tratamento glicerol 3% apresentou valores inferiores ($P<0,05$) para aPMM e iAc em relação aos demais tratamentos (Tabela 1). No estudo da cinética não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) para os parâmetros avaliados (Tabela 2). O tempo de estabilização de 4h apresentou valores numericamente superiores de MT, em relação aos demais tempos em um mesmo tratamento (Tabela 2), com valores próximos a 70% de motilidade total. Da mesma forma, a MP foi maior no tempo de 4h, com valores acima de 33%.

A avaliação de fertilidade de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros foi realizada após a obtenção dos grupos que apresentaram melhores resultados na análise de integridade de membrana e cinética espermática. Foram utilizados 129 oócitos, dos quais 74 (57,36%) clivaram e 52 (40,31%) desenvolveram até o estágio de blastocisto.

A concentração de glicerol ideal para uso na criopreservação tem sido estudada há muitos anos (GRAHAM et al., 1957; COCHRAN et al., 1984). A maioria dos trabalhos relata que a concentração ótima deste crioprotetor para preservação de espermatozoides bovinos encontra-se entre 4 e 8%. No entanto, existem poucos trabalhos com congelação de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros, tendo sido testadas as concentrações de 7% (MARTINS et al., 2007; MARTINS et al., 2009) e 8% de glicerol (SAENZ, 2007). Em outras espécies, Kaabi et al. (2003) utilizaram 4% de glicerol na criopreservação de espermatozoides de carneiros e Cardoso et al. (2003) verificaram que o glicerol pode ser utilizado nas concentrações de 4, 6 e 8 % na criopreservação de espermatozoides do ejaculado de cães. Desta forma, torna-se necessário testar qual a concentração mais indicada de glicerol para criopreservação destes gametas na espécie bovina obtidos da cauda do epidídimo.

Neste estudo verificou-se que o glicerol a 3% não foi suficiente para proteger as membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides obtidos do epidídimo de touros. Estes achados corroboram com os relatos de Leite et al. (2010), que trabalhando com amostras de sêmen de touro, encontraram menor proteção para as células espermáticas ao utilizar concentrações mais baixas de glicerol. Foi observado também que as

concentrações de 5 e 7% não diferiram significativamente ($P>0,05$). No entanto, a concentração de 5% apresentou valores numericamente superiores aos demais tratamentos.

Na avaliação da cinética espermática, a concentração de 3% apresentou valores numericamente inferiores para MT e MP, quando comparados aos grupos 5 e 7%, comprovando que o glicerol 3% não protege os espermatozoides dos danos causados pela criopreservação. Para os parâmetros de velocidade, a concentração de 5% apresentou os melhores resultados, que também apresentou maiores ($P<0,05$) valores de BCF, sugerindo que este extensor foi mais eficaz na preservação das estruturas flagelares. Este resultado provavelmente está relacionado ao fato da concentração ter conferido maior interação com o extensor, estimulando a produção de ATP e, conseqüentemente, a frequência de batimentos da cauda (CELEGHINI et al., 2008). Este resultado também justifica a utilização do glicerol 5%, uma vez que utiliza menos crioprotetor, além de determinar menor exposição das células espermáticas aos danos causados pela sua toxicidade.

Em uma extensa revisão da literatura Pickett e Berndtson (1978) discutiram que o tempo de estabilização ideal pode depender da qualidade de sêmen, da composição do diluidor e dos modelos de processamento. Fato observado por Muinõ et al. (2007), que, testando diferentes diluidores e 18h com tempo de equilíbrio, relataram que diluentes à base de gema de ovo proporcionam maior sobrevivência e longevidade aos espermatozoides, quando comparados aos diluentes à base de soja.

A duração mínima do tempo de equilíbrio necessário para ter resultados satisfatórios na criopreservação de espermatozoides permanece controverso (DHAMI et al., 1992; DHAMI e SAHNI, 1993). Em trabalho com o intuito de avaliar a possibilidade de reduzir o tempo de equilíbrio (0, 2 e 4h), Leite et al. (2010) avaliaram a MT e MP pelo sistema CASA e observaram que, quando submetidos a 4h de estabilização, os espermatozoides evidenciavam melhores resultados, não diferindo significativamente ($P>0,05$) do uso de 2h de estabilização.

Ao estudar o tempo de equilíbrio, verificou-se neste estudo que de 0h apresentou valores inferiores ($P<0,05$) para aPMM e iAc, quando comparados aos tempos de 2 e 4h, o que confirma os relatos de Berndtson e Foote (1969), ao afirmaram que o tempo de equilíbrio é importante para adaptar as membranas do espermatozoide às baixas temperaturas. Anos mais tarde Amann e Pickett (1987) ratificaram esta afirmação, relatando que os danos às membranas plasmáticas, membranas acrossomal e função mitocondrial em espermatozoides criopreservados ocorre devido a alterações na

temperatura e na osmolaridade, que causam alterações morfológicas na organização de lípidos e na composição da membrana de espermatozoides.

No entanto, os resultados obtidos neste estudo divergem daqueles apresentados por Herold et al. (2006), que avaliando diferentes tempos de estabilização (2 a 9h) nos espermatozoides de búfalos não encontraram diferença significativa para MT, MP e integridade de membrana acrossomal. Estes resultados também ratificam os relatos de Wiggin e Almquist (1975), que também não encontraram diferença ao avaliarem os tempos de estabilização de 1/2 e 2h, possivelmente pelo fato de esses dois tempos não serem suficientes para proteger as membranas.

As taxas de MT e MP foram menores numericamente no tempo 0h, quando comparadas a 2 e 4h, confirmando a necessidade do tempo de equilíbrio a 5 °C para preservar a motilidade dos espermatozoides. Esses dados corroboram com diversos relatos de sêmen de bovinos, onde o maior tempo de estabilização proporciona maior proteção aos espermatozoides (GRAHAM et al., 1957; LEITE et al., 2010), e em outras espécies, como carneiros (CÂMARA et al., 2011). Dhami e Sahni (1993) relataram que a refrigeração lenta e o tempo de equilíbrio de pelo menos 2h a 5 °C melhora significativamente a motilidade pós-descongelação (44,0 versus 35,5%), em comparação com nenhum tempo de equilíbrio.

O resultado obtido no teste de fertilidade FIV mostrou que a utilização de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo pode ser uma alternativa para a conservação do material genético de animais com alto valor zootécnico ou de animais em extinção. Ressalta-se que a taxa de blastocisto observada neste estudo foi superior àquelas observadas em outros trabalhos desenvolvidos no laboratório, onde se obteve média de 34% de blastocistos formados, ao se utilizar espermatozoides obtidos do ejaculado de touros e submetidos à congelação pelas três principais centrais de sêmen do Brasil, assim como também foi superior à média nacional de 32% (VIANA et al., 2012).

Com base nos resultados de integridades das membranas, cinética e fertilização *in vitro*, é possível concluir ser possível criopreservar espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros utilizando meio de diluição acrescido de glicerol na concentração de 5% e tempo de estabilização a 5 °C de 4h. Ressalta-se que espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros podem ser utilizados com sucesso em programas de FIV.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo para a realização do Mestrado; à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro; ao Matadouro Municipal de Paulista-PE, pela concessão dos testículos utilizados no experimento; aos Matadouros Frifeira, Frigoalas e Frigosserra, pela concessão dos ovários utilizados para fertilização *in vitro*; assim como à Ciclo Veterinária, por disponibilizar o laboratório para realização da FIV.

Referências

- ALMEIDA, F.C.; GOMES, W.A.; SOUZA, H. M.; BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Effect of stabilization time on cryopreservation of spermatozoa obtained from bull epididymis. **Animal Reproduction**. v. 9, p. 959, 2012.
- AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145–173. 1987.
- BERNDTSON, W.E.; FOOTE, R.H. The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glycerol. **Cryobiology**, v. 5, p. 398–402, 1969.
- CÂMARA, D.R.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J. F.; GUERRA, M. M. P. Effect of the addition of antioxidants and different pre-freezing equilibration times on the quality of frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v. 76, p. 342 - 350, 2011.
- CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; UCHOA, D.C.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, v. 59, p. 743-751, 2003.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**. v. 104, p. 119–131. 2008.
- COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P.; PICKETT, B. W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 50C, freezing rate and thawing rate on the post thaw motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 22, p. 25-38, 1984.

- DHAMI, A.J.; SAHNI, K.L. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 40, p. 1269–1280, 1993.
- DHAMI, A.J.; SAHNI, K.L.; MOHAN, G. Effect of various cooling rates (from 30 °C to 5°C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos taurus* and *Bos bubalis* semen. **Theriogenology**, v. 38, p. 565–574, 1992
- GOOVAERTS I.G.F.; HOFACK G.G.; VAN SOOM A.; DEWULF J.; NICHI M.; KRUIF A.; BOLS P.E.J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two cauda e epididymides of the same Bull. **Theriogenology**, v. 66, p. 323-330, 2006.
- GRAHAM, E.F.; ERICKSON, W.E.; BAYLEY, N.D. Effect of glycerol equilibration on frozen bovine spermatozoa. **Journal of Dairy Science**. v. 40, p. 510–515. 1957.
- HEROLD, F.C.; DE HAAS, K.; COLENBRANDER, B.; GERBER, D. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®. **Theriogenology**, v. 66, p. 1123–1130, 2006.
- HERRERA, C.; MIRAGAYA, H.M.; CONDE, P.; HYNES, V.; LOSINNO, L.; QUINTANS, C.; PASQUALINI, R.S. Intracytoplasmic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 299-302, 2006.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.
- KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v. 60, p. 1249–1259, 2003.
- LEITE, T.G.; VALE FILHO, V.R.; ARRUDA R.P.; ANDRÉ, ANDRADE, A.F.C.; EMERICK, L.L.; ZAFFALON, F.G.; MARTINS, J.A.M.; ANDRADE, V.J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 31–38, 2010.
- LEMMA, A. **Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility**. In: MANAFI, M. Artificial Insemination in Farm Animals, InTech, 2011, 300 p.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MERNARD, M. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1250–1258, 2002.

MARTINS, C.F.; DRIESSEN, K.; MELO COSTA, P.; CARVALHO-NETO, J.O.; SOUSA, R.V.; RUMPF, R.; DODE, M.N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides Stored at 5 °C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**, v. 116, p. 50-57, 2009.

MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 326–331, 2007.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5° Ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. 344p.

MONTEIRO, G.A.; GUASTI, P.N.; MELO, C.M.; DELLAQUA JR. J.A.; MARTIN, J.C.; CARNEIRO, R.; PAPA, F.O. Comparison between cooled sperm from ejaculate and epididymal cauda In: In: CONGRESS OF THE WORLD EQUINE VETERINARY ASSOCIATION - WEVA, 11., Guarujá. **Proceedings...** Guarujá, 2009, 1 CDRoom.

MUIÑO, R.; FERNÁNDEZ, M.; PEÑA, A.I. Post-thaw survival and longevity of bulls spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolkfree extenders after an equilibration period of 18 h. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 305–311, 2007.

PAPA, F.O.; MELO, C.M.; FIORATTI E.G.; DELLA'QUA, J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 293-301, 2008.

PICKETT, B.W., BERNDTSON, W.E., 1978. **Principles and techniques of freezing spermatozoa**. In: Salisbury, G.W., Vandemark, N.L., Lodge, J.R. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. 2.ed., San Francisco: WH Freeman and Company. 798p.

SAENZ, J.R. **Cryopreservation of white-tail deer epididymal sperm for Artificial insemination**. 2007. 148p. Tese (Master of Science). The Interdepartmental Program of Animal and Dairy Sciences. New Mexico State University, Louisiana, 2010.

SILVA, A.E.D.F.; DIAS, A.L.; UNANIAN, M.M.; FREITAS, A.R.; BLOCH, C.J. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1890-1900, 2003.

SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 874-881, 2011.

SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, 2013 (no prelo).

TIPLADY, C.A.; MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. **Theriogenology**, v. 58, n. 2, p. 225-228, 2002.

TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C.A.; ARNAUDÍN, E.; STORNELLI, M.C.; STORNELLI, M.A.; DE LA SOTA, R.L. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v. 66, n. 6, p. 1637-40, 2006.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 12-18, 2012.

WIGGIN, H. B.; ALMQUIST, J.O. Effect of glycerol equilibration time and thawing rate upon acrosomal maintenance and motility of bull spermatozoa frozen in plastic straws. **Journal of Animal Science**, v. 40, n. 2, p. 302-305, 1975.

Tabela 1. Porcentagem (média \pm dp) dos parâmetros de integridade de espermatozoides bovinos obtidos na cauda do epidídimo de touros Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, submetidos a diferentes concentrações de glicerol e diferentes tempos de estabilização a 5 °C

Tempo*	Tratamento	iMP (%)	aPMM (%)	iAc (%)
0h	Glicerol 3%	55,19 \pm 14,65	77,88 \pm 11,21	59,75 \pm 7,54
	Glicerol 5%	60,19 \pm 18,16	56,19 \pm 30,06 ^B	64,06 \pm 6,04 ^B
	Glicerol 7%	56,50 \pm 20,53	78,56 \pm 13,29	68,94 \pm 10,30
2h	Glicerol 3%	47,25 \pm 4,77	64,75 \pm 25,79	66,69 \pm 8,43
	Glicerol 5%	53,44 \pm 15,07	66,69 \pm 18,55 ^{AB}	77,75 \pm 9,26 ^A
	Glicerol 7%	54,63 \pm 16,34	67,56 \pm 24,45	69,94 \pm 11,44
4h	Glicerol 3%	55,13 \pm 13,80 ^b	74,81 \pm 20,85	57,94 \pm 7,46 ^b
	Glicerol 5%	68,50 \pm 10,52 ^a	83,81 \pm 12,23 ^A	71,50 \pm 10,07 ^{aAB}
	Glicerol 7%	68,94 \pm 7,33 ^a	72,06 \pm 23,55	64,38 \pm 7,67 ^{ab}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos no mesmo tempo de estabilização. Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tempos de estabilização no mesmo tratamento. P<0.05. *Tempo de estabilização a 5 °C. iMP: integridade de membrana plasmática; aPMM: alto potencial mitocondrial; iAc: integridade do acrossoma.

Tabela 2. Porcentagem (média \pm dp) dos parâmetros cinéticos de espermatozoides bovinos obtidos na cauda do epidídimo de touros Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, submetidos a três diferentes concentrações de glicerol em diferentes tempos de estabilização a 5 °C

Tempo*	Tratamento	MT (%)	MP (%)	VCL (μm/s)	VSL (μm/s)	VAP (μm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0h	Glicerol 3%	55,89 \pm 16,84	22,38 \pm 6,24	55,97 \pm 9,29	26,43 \pm 4,78	35,78 \pm 6,92	47,71 \pm 8,84	74,28 \pm 8,59	63,93 \pm 5,84	2,66 \pm 0,47	9,84 \pm 1,54
	Glicerol 5%	70,79 \pm 17,05	32,56 \pm 10,39	62,59 \pm 10,45	29,18 \pm 4,25	38,96 \pm 5,19	47,18 \pm 6,15	75,01 \pm 5,34	62,66 \pm 4,40	2,90 \pm 0,45	10,40 \pm 1,15
	Glicerol 7%	58,94 \pm 22,56	28,30 \pm 12,20	63,75 \pm 13,48	28,78 \pm 6,64	39,76 \pm 9,81	45,83 \pm 9,16	72,84 \pm 7,03	62,47 \pm 7,20	2,69 \pm 0,55	10,16 \pm 1,29
2h	Glicerol 3%	57,48 \pm 13,29	24,68 \pm 6,10	54,60 \pm 7,26	26,68 \pm 6,88	35,02 \pm 7,62	48,50 \pm 8,66	75,75 \pm 4,73	63,67 \pm 7,61	2,65 \pm 0,29	9,87 \pm 0,36 ^b
	Glicerol 5%	66,85 \pm 23,38	31,64 \pm 11,89	61,24 \pm 9,34	29,58 \pm 4,43	38,79 \pm 6,54	48,56 \pm 4,84	76,59 \pm 4,83	63,39 \pm 4,90	2,79 \pm 0,36	11,40 \pm 1,29 ^a
	Glicerol 7%	72,00 \pm 10,64	26,93 \pm 10,96	57,39 \pm 8,99	23,33 \pm 6,63	33,19 \pm 6,45	40,66 \pm 8,64	69,68 \pm 8,09	57,81 \pm 5,60	2,97 \pm 0,60	10,12 \pm 1,45 ^b
4h	Glicerol 3%	69,24 \pm 20,69	33,66 \pm 16,10	59,67 \pm 12,88	30,24 \pm 7,92	38,49 \pm 8,58	50,30 \pm 4,56	78,03 \pm 4,66	64,42 \pm 3,10	2,77 \pm 0,23 ^b	11,08 \pm 1,90
	Glicerol 5%	71,83 \pm 17,36	34,33 \pm 13,29	73,38 \pm 17,17	34,41 \pm 13,49	44,95 \pm 13,49	46,20 \pm 9,56	75,26 \pm 7,15	60,90 \pm 7,33	3,23 \pm 0,56 ^a	11,07 \pm 2,37
	Glicerol 7%	79,33 \pm 14,62	36,28 \pm 11,27	68,21 \pm 11,18	29,01 \pm 4,68	40,46 \pm 6,92	42,80 \pm 5,01	71,90 \pm 4,87	59,38 \pm 3,52	2,99 \pm 0,12 ^{ab}	11,16 \pm 1,54

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos no mesmo tempo de estabilização. *Tempo de estabilização a 5 °C. MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea; VSL: velocidade em linha reta; VAP: velocidade média do trajeto; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: índice de oscilação; ALH: amplitude lateral de cabeça; BCF: batimento flagelar cruzado.

5.2 Efeito da adição de Catalase e Superóxido Dismutase ao diluente de congelação de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros da raça Nelore

Felipe Costa Almeida¹, Sildivane Valcácia Silva¹, Helder Melo de Souza¹, André Mariano Batista¹, José Adalberto Caetano de Lima Filho¹, Aparecida Argolo Wicke², Maria Madalena Pessoa Guerra¹

¹Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Depto de Medicina Veterinária, UFRPE – Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife- PE. CEP: 52.900-171. ²Ciclo Veterinária, Franquia CENATTE, São Gonçalo, Bahia

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a fertilidade de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros da raça Nelore e submetidos à congelação em diluente suplementado com os antioxidantes Catalase (CAT) e Superóxido Dismutase (SOD). Os epidídimos foram obtidos em matadouro, até uma hora após a morte do animal, e transportados em caixa térmica em temperatura ambiente (28 °C). No laboratório, os espermatozoides foram recuperados pela técnica de flutuação, em, aproximadamente, 5,0 mL de solução Tris e diluídos em Tris-gema. A seguir, as amostras foram divididas em grupos experimentais (Controle, CAT 50 e 100 U/mL e SOD 50 e 100 U/mL), na concentração de 60×10^6 espermatozoides/mL, acondicionadas em palhetas (0,25 mL) e congeladas em máquina. Após descongelação (37°C/ 30 segundos), as amostras foram avaliadas quanto à integridade de membrana plasmática (iMP), integridade do acrossoma (iAc), potencial de membrana mitocondrial (pMM), cinética espermática (CASA) e capacidade fertilizante pela técnica de fertilização *in vitro*. Todos os grupos experimentais apresentaram motilidade superior a 60%. As análises de iMP, iAc e pMM não evidenciaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre grupos. Os parâmetros de MT, MP, VCL, VSL, VAP, STR, ALH e BFC não diferiram ($P > 0,05$) entre o grupo controle e os grupos tratados. Ainda, diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre os grupos para Linearidade (LIN) e no índice de oscilação (WOB), sendo o tratamento SOD 100 inferior ($P < 0,05$) aos demais grupos. A adição de SOD 100 também determinou menores ($P < 0,001$) porcentagens de blastocistos após a clivagem. Com base nos resultados de cinética e fertilização *in vitro*, é possível concluir que a adição de CAT nas concentrações de 50 e 100 U/mL e SOD na concentração de 50 U/mL, não influencia na qualidade espermática. No entanto, a adição de SOD na concentração de 100 U/mL reduz a fertilidade dos espermatozoides criopreservados. Ainda, ressalta-se que espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros podem ser utilizados com sucesso em programas de FIV.

Palavras-chave: Espermatozoides, antioxidantes, viabilidade, fertilização *in vitro*.

ABSTRACT

This paper aimed to study fertility of spermatozoa obtained from epididymis tail of Nelore bulls and subjected to freezing in extender supplemented with catalase (CAT) and

superoxide dismutase (SOD). Epididymis were obtained from slaughterhouse until one hour after the animal's death, and transported in box at room temperature (28 °C). In laboratory, spermatozoa were recovered by flotation in approximately 5.0 mL of Tris and diluted in Tris-yolk egg. Next, samples were divided into experimental groups (control, CAT 50 and 100 U/mL, and SOD 50 and 100 U/mL) at a concentration of 60×10^6 spermatozoa/mL, packaged in straws (0.25 mL) and frozen in automated system. After thawing (37 °C/ 30"), samples were evaluated for plasma membrane integrity (iMP), acrosome integrity (iAc), mitochondrial membrane potential (MMP), sperm kinematics (CASA) and the fertilizing ability by IVF technique. All experimental groups showed greater than 60% motility. No significant difference ($P>0.05$) was observed for iMP, iAc and PMM analysis between groups. Parameters of MT, MP, VCL, VSL, VAP, STR, ALH and BFC did not differ ($P>0.05$) between control and treated groups. However, significant differences ($P<0.05$) were observed between groups for Linearity (LIN) and the oscillation index (WOB), being less than 100 SOD treatment ($P<0.05$) than other groups. Addition of SOD 100 also determined lower ($P<0.001$) percentages of blastocysts after cleavage. Based on results of kinematic and IVF, it can be concluded that no effect on sperm quality in CAT addition in concentrations of 50 and 100 U/mL, and SOD at concentration of 50 U/mL. However, SOD addition at a concentration of 100 U/mL reduces sperm cryopreserved fertility. However, it is noteworthy that sperm obtained from epididymis tail of Nelore bulls can be successfully used in IVF programs.

Keyword: Spermatozoa, antioxidants, viability, *in vitro* fertilization.

Introdução

O material genético proveniente de animais de interesse econômico ou silvestres pode ser perdido em virtude da morte prematura do animal. No entanto, esforços têm sido realizados por meio da utilização de técnicas de reprodução assistida para evitar a perda total deste material genético.

A recuperação e a criopreservação de espermatozoides do epidídimo obtidos de animais mortos é uma opção viável para preservar os gametas masculinos e, dessa forma, manter um banco de germoplasma (TITTARELLI et al., 2006). Os procedimentos de isolamento de espermatozoides do epidídimo de animais mortos, a criopreservação e subsequente utilização na técnica de fecundação *in vitro* (FIV), são importantes ferramentas para resgatar o material genético que poderia ser perdido, tanto de animais de produção quanto de espécies em extinção (MARTINS et al., 2007).

No entanto, a criopreservação causa danos à célula espermática. A membrana plasmática do espermatozoide é considerada o local primário de danos durante o processo de criopreservação (WATSON, 1995). Alguns estudos têm demonstrado que os efeitos

osmótico e da temperatura, determinados pelos procedimentos de congelação e descongelação, induzem grandes alterações no volume de água, resultando em considerável estresse mecânico nas membranas celulares (NOILES et al., 1995). Quando o sêmen é utilizado em programas de reprodução assistida, tanto na fertilização *in vitro* quanto *in vivo*, o mesmo será exposto ao oxigênio e à radiação de luz visível durante as várias etapas de seu processamento, o que pode determinar formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e danos à motilidade celular e integridade do DNA (FOOTE et al., 2002).

Estudos demonstram que antioxidantes naturais presentes no plasma seminal exercem efeito protetor sobre a membrana plasmática dos espermatozoides, preservando tanto a atividade metabólica quanto a função celular (O' FLAHERTY et al., 1997). No entanto, em estudos de espermatozoides de espécies diferentes, é evidente que a proteção pelo sistema antioxidante natural não é suficiente, fazendo o espermatozoide ser submetido à peroxidação lipídica, principalmente na presença de oxigênio (FOOTE et al., 2002).

A Catalase (CAT) e a Superóxido dismutase (SOD) são enzimas antioxidantes ativas no combate das ROS. A exceção dos espermatozoides de coelho, as concentrações de CAT são muito baixas nos gametas masculinos de mamíferos (FOOTE e HARE, 2000). Em virtude disso, o plasma seminal de coelho é capaz de proteger eficazmente os espermatozoides contra elevadas concentrações de H₂O₂ endógeno. A SOD no espermatozoide humano desempenha um papel importante na prevenção da peroxidação lipídica (STOREY, 1997).

Todavia, nos estudos que utilizam espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo, estes efeitos determinados pelos antioxidantes naturais encontrados no plasma seminal não estão presentes para proteger estes gametas dos danos causados pelas ROS. Por isso, objetivou-se com este estudo avaliar os efeitos da suplementação do diluidor de congelação (Tris-gema-glicerol) com os antioxidantes CAT e SOD na viabilidade destes espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo e criopreservados.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizados oitenta testículos de touros da raça Nelore, com idade variando entre 36 e 60 meses, pesando entre 500 e 600 Kg, obtidos em matadouros localizados na Zona da Mata do Estado de Pernambuco. Os testículos eram recolhidos até uma hora após a morte do animal e transportados em temperatura ambiente (28 °C) ao Laboratório de Andrologia da UFRPE.

Recuperação dos espermatozoides

No laboratório, os epidídimos foram isolados dos testículos e higienizados em álcool 70% (MARTINS, 2007). A seguir, os espermatozoides foram recuperados da cauda do epidídimo pela técnica de flutuação (ALMEIDA et al., 2012), durante 10 minutos, em placa de Petri contendo 5 mL de solução Tris (3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose; 100 mL de água bidestilada; pH 7,0) aquecida a 37 °C.

Seleção dos espermatozoides epididimários

As amostras obtidas de cada epidídimo foram avaliadas individualmente quanto a motilidade subjetiva (utilizando 10 µL de cada amostra, colocada entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37 °C). As amostras que apresentavam mais de 50% de motilidade foram utilizadas no experimento, seguindo as recomendações de Silva et al. (2003).

Congelação do sêmen

Inicialmente foram formados *pools* (n =11) de espermatozoides, contendo espermatozoides de cinco epidídimos, em diferentes dias, os quais foram previamente aprovados e submetidos à análise de concentração espermática, com diluição de 1:200 em formol salino (Câmara de Neubauer; MIES FILHO, 1987). A seguir, os *pools* foram diluídos em solução de Tris-gema (3,605 g Tris; 2,024 g ácido cítrico; 1,488 g frutose; 100 mL de água bidestilada; 20% gema de ovo; 5% glicerol; pH 7,0), e o seu volume foi dividido em cinco amostras, constituindo os grupos experimentais (controle, CAT 50, CAT 100, SOD 50 e SOD 100). A seguir, as amostras de cada grupo foram acondicionadas em palhetas (0,25 mL) identificadas, na concentração final de 80×10^6 espermatozoides/mL. Para congelação foi utilizado o tempo de estabilização de 4h a 5 °C, utilizando o método automatizado (TK-3000®, TK Tecnologia em congelação LTDA, Uberaba, Brasil). Após o

término da congelação, as doses de sêmen foram armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C).

Analises pós-descongelação

Após descongelação (37 °C durante 30 segundos), alíquotas de sêmen de cada grupo foram submetidas às análises de avaliação de integridade espermática em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany), cinética em sistema computadorizado (SCA® Microptic, Barcelona, Spain) e teste de fertilidade pelo método de fertilização *in vitro* (FIV).

Para análise da integridade espermática por sondas fluorescentes, avaliou-se a integridade da membrana plasmática (iMP) pelo método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e Iodeto de Propídio (IP), segundo Silva et al. (2011). Um total de 200 espermatozoides foram avaliados em aumento de 400x, usando filtro de emissão DBP 580-630nm e excitação DBP 485/20nm, e classificados como membrana intacta quando corados em verde ou membrana danificada quando corados em vermelho. Para análise de integridade do acrossoma (iAc), usou-se Isocianato de Fluoresceína conjugado a Peanut Agglutinin (FITC-PNA; SILVA et al., 2013). Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. Os gametas foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentaram a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou acrossoma reagido, quando apresentavam uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda a cabeça. Para análise de potencial da membrana mitocondrial (PMM), utilizou-se Fluorocromo Catiônico Lipofílico JC-1 (CÂMARA et al., 2011), sendo avaliados 200 espermatozoides com aumento de 400x usando filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas como portadoras de alto PMM, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas como portadoras de baixo PMM.

Para análise da cinética espermática, utilizou-se 10 µL da amostra de sêmen (37 °C), examinada em microscópio de contraste de fase (100x) acoplado ao sistema CASA, no qual se observaram os parâmetros de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL, µm s⁻¹), velocidade em linha reta (VSL, µm s⁻¹), velocidade média do trajeto (VAP, µm s⁻¹), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR,

%), oscilação (WOB, %), amplitude de deslocamento da cabeça (ALH, μm) e frequência do batimento de flagelo (BCF, Hz), segundo VERSTEGEN et al. (2002).

Para avaliar a fertilidade do sêmen foi utilizada a FIV, com a utilização de oócitos obtidos em matadouros. Os complexos cumulus oócitos (CCO) bovinos foram transferidos para placas de petri contendo sete poços e submetidos à maturação *in vitro* durante 24h em meio TCM-199 suplementado com 10% de soro de égua em estro (SEE), 0,025 mg/mL de piruvato de sódio, 2,2 mg/mL de NaHCO_3 , 0,01 UI de rFSH-h/mL, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de LHh, submerso em óleo mineral, em atmosfera com 5% de CO_2 a 39 °C. Para fecundação, o sêmen foi selecionado em gradiente de Percoll, capacitado com heparina, hiperativado com PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina) e utilizado na concentração final ajustada para 1×10^6 spz/mL. Após o período de maturação, os CCO foram transferidos para outra placa de petri contendo 400 μL de meio Fert-Talp, onde permaneceram durante 18 a 20h em atmosfera contendo 5% de CO_2 em ar e temperatura de 39 °C. A seguir, os presumíveis zigotos foram lavados em meio de cultura de embrião e transferidos para outra placa contendo meio de cultura (ácido SOF, suplementado com 2.77 mM de mio-inositol e FCS a 5%) e colocados em atmosfera umidificada de 5% de CO_2 em ar a 39 °C. Os embriões foram avaliados no segundo dia, pós-inseminação, para análise de clivagem e no oitavo dia para análise da taxa de blastocisto.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F) com medidas repetidas no tempo, e, nos casos de significância no teste F, as médias foram comparadas pela diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de Student-Newman-Keuls, adotando o nível de significância (p) de 5%. Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2009). Para o teste de fertilidade, realizou-se análise de dispersão das frequências, utilizando-se o teste de qui-quadrado, adotando o nível de significância (p) de 1%.

Resultado e discussão

A motilidade espermática total das amostras submetidas a congelação foi superior a 60% em todos os grupos experimentais. Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos trabalhados para os valores de integridade de membrana plasmática e

membrana acrossomal, assim como para o potencial de membrana mitocondrial, avaliados por sondas fluorescentes (Tabela 1).

A análise da cinética de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros e submetidos à congelação (Tabela 2) não constatou diferença significativa ($P > 0,05$) nos parâmetros de MT, MP, VCL, VSL, VAP, STR, ALH e BFC, entre o grupo controle e os grupos tratados. No entanto, as análises de LIN e WOB evidenciaram que a adição de SOD, na concentração de 100 U/mL, determinou a ocorrência de valores inferiores ($P < 0,05$) aos dos grupos Controle e CAT (50 e 100 U/mL).

Na produção *in vitro* de embriões, as taxas de clivagem não diferiram significativamente entre os grupos (Tabela 3). No entanto, quando se avaliou a viabilidade dos embriões clivados, observou-se que o grupo SOD 100 mostrou-se inferior aos outros demais grupos na formação de blastocistos ($P < 0,001$) (Tabela 4).

O citoplasma das células somáticas contém vários sistemas de antioxidantes enzimáticos, como por exemplo, a SOD e CAT. No entanto, as células espermáticas são desprovidas da maior parte deste citoplasma, fornecendo assim uma pequena proteção contra ROS (LI 1975). A enzima SOD, de ação enzimática, possui um importante papel antioxidante, uma vez que catalisa a dismutação do ânion superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). A enzima CAT, por sua vez, age catalisando a reação que transforma duas moléculas de H_2O_2 em duas moléculas de H_2O e uma de O_2 (NORDERBERG, 2001).

O fato da integridade da membrana plasmática não ter determinado diferença significativa já havia sido observado em um estudo prévio (ALMEIDA et al., 2012), onde os autores avaliaram o melhor tempo de estabilização para a criopreservação dos espermatozoides obtidos do epidídimo de touros e constataram que a utilização de 4 horas preservou melhor a integridades dos espermatozoides. No entanto, estes autores não avaliaram a integridade do acrossoma, nem o potencial de membrana mitocondrial, que, provavelmente, teriam determinado melhores resultados após 4 horas de estabilização, em virtude dos relatos de Câmara et al. (2011), os quais observaram que um maior tempo de estabilização conserva melhor os espermatozoides obtidos de reprodutores ovinos.

Em trabalho utilizando espermatozoides bovinos, Fernández-Santos et al. (2008) utilizaram Catalase em meio utilizado para diluir as amostras após a descongelação e encontraram aumento da viabilidade espermática no grupo em que utilizou a CAT na concentração de 100 U/mL. Em contrapartida, no presente estudo a CAT foi adicionada no

momento da diluição do sêmen e não foi observado nenhum efeito de sua utilização. Este resultado pode ser explicado pelo fato de os espermatozoides obtidos do epidídimo respirarem em um ritmo muito mais lento do que aqueles provenientes do ejaculado, resultando em maior eficiência na utilização de energia oxidativa (LARDY e GHOSH, 1952).

O fato das amostras espermáticas suplementadas com SOD 100 apresentarem valores inferiores para LIN e WOB, quando comparados aos dos demais grupos experimentais, explicam o resultado obtido na FIV, uma vez que a SOD 100 também determinou menor porcentagem de blastocistos nos oócitos clivados. Todavia, ressalta-se que Martínez-Rodríguez (2005) verificou que das variáveis analisadas pelo sistema CASA, a linearidade espermática parece apresentar maior correlação com fertilidade, onde valores inferiores de LIN significa menor quantidade de células com movimento em linha reta, assim como foi observado nesse experimento. Este resultado pode interferir negativamente nos índices de fertilidade, uma vez que espermatozoides com tal característica apresentam menor vida útil no sistema reprodutor da fêmea (GILLAN et al., 2008). Observando ainda que o WOB mede a proporção entre VAP e VCL, quanto menor este índice, menor a quantidade de células em movimento real progressivo, o que caracterizaria menor índice de fertilidade, como os verificados neste presente estudo.

A FIV consiste em uma excelente ferramenta para investigar a capacidade dos espermatozoides portadores de morfologia anormal em promover a fecundação e o desenvolvimento embrionário. Ressalta-se ainda, que o uso da produção *in vitro* de embriões permite observações diretas e repetidas das interações espermatozoide-oócito (THUNDATHIL, 2001).

A taxa de clivagem obtida neste estudo foi semelhante àquela encontrada em outros experimentos com espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo, como, por exemplo, ao se utilizar espermatozoides de carneiros e constatar que a taxa de clivagem variou entre 45 e 58% para os espermatozoide conservados a temperaturas de 5 ou 28 °C durante 24 horas após a morte do animal. No entanto, ao se aumentar o tempo de observação 48 horas, os resultados obtidos foram significativamente inferiores (KAABI et al., 2003). Martins et al. (2007), avaliando a fertilidade de espermatozoides obtidos dos epidídimos de três touros, encontraram uma taxa de clivagem bem superior a encontradas neste experimento. No entanto, a formação de blastocistos não diferiu entre os experimentos.

O resultado da taxa de blastocistos com espermatozoides obtidos do epidídimo e submetidos à congelação nos diferentes grupos experimentais (Tabela 5) não diferiu de outros trabalhos desenvolvidos no laboratório, onde se obteve média de 34% de blastocistos formados, ao se utilizar espermatozoides obtidos do ejaculado de touros e submetidos à congelação pelas três principais centrais de sêmen do Brasil, assim como não diferiu da media nacional de 32% (Viana et al.,2012).

Com base nos resultados de cinética e fertilização *in vitro*, é possível concluir que a adição de CAT nas concentrações de 50 e 100 U/mL e SOD na concentração de 50 U/mL, não influencia na qualidade espermática. No entanto, a adição de SOD na concentração de 100 U/mL reduz a fertilidade dos espermatozoides. Todavia, ressalta-se que espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo de touros podem ser utilizados com sucesso em programas de FIV.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa durante a realização do Mestrado; à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro; ao Matadouro Municipal de Paulista-PE, pela concessão dos testículos utilizados no experimento, assim como aos Matadouros Frifeira, Frigoalas e Frigosserra, pela concessão dos ovários utilizados; e a Ciclo Veterinário, por disponibilizar o laboratório para realização da FIV.

Referências

ALMEIDA, F.C.; GOMES, W.A.; SOUZA, H. M.; BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Effect of stabilization time on cryopreservation of spermatozoa obtained from bull epididymis. **Animal Reproduction**. v. 9, p. 959, 2012.

- CÂMARA, D.R.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J. F.; GUERRA, M. M. P. Effect of the addition of antioxidants and different pre-freezing equilibration times on the quality of frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v. 76, p. 342 - 350, 2011.
- FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C.; GARDE, J. J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. **International Journal of Andrology**, v. 32, p. 353–359, 2008.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FOOTE, R.H.; HARE, E. High catalase content of rabbit semen appears to be inherited. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 664–668, 2000.
- FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 13-23, 2002.
- GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 201-214, 2008.
- KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v. 60, p. 1249–1259, 2003.
- LARDY, H. A.; GHOSH, D. Comparative metabolic behavior of epididymal and ejaculated mammalian spermatozoa. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 55, p. 594-596, 1952.
- LI, T.-K. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 12, p. 641–646, 1975.
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. **Anais.....** Goiânia: Goiás, 2005.
- MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 101, p. 326–331, 2007.

- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5° Ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. 344p.
- 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.
- NORDERBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.
- O'FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxido dismutase and hydrogem peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, p. 269-275, 1997.
- SILVA, A.E.D.F.; DIAS, A.L.; UNANIAN, M.M.; FREITAS, A.R.; BLOCH, C.J. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1890-1900, 2003.
- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 874-881, 2011.
- SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, 2013 (no prelo).
- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM INSTITUTE. **SAS user's Guide**: Statistics version. Cary, New York. 2009.
- STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 203-214, 1997.
- THUNDATHIL, J.; PALASZ, A.T.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. **Journal of Animal Reproduction Science**. v. 65, p. 181–192, 2001.
- TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C.A.; ARNAUDÍN, E.; STORNELLI, M.C.; STORNELLI, M.A.; DE LA SOTA, R.L. Effect of storage media and storage time on

survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v. 66, n. 6, p. 1637-40, 2006.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 12-18, 2012.

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

Tabela 1. Porcentagem (média \pm dp) dos parâmetros de integridade de espermatozoides bovinos obtidos na cauda do epidídimo de touros Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, acrescido ou não de antioxidantes enzimáticos.

Tratamentos	iAc (%)	aPMM (%)	iMP (%)
Controle	49,55 \pm 4,46	32,82 \pm 28,34	62,86 \pm 6,47
CAT 50 U/mL	48,27 \pm 5,53	51,50 \pm 35,82	63,73 \pm 8,71
CAT 100 U/mL	50,82 \pm 4,89	53,18 \pm 32,66	65,05 \pm 10,68
SOD 50 U/mL	51,73 \pm 4,01	57,18 \pm 27,14	57,32 \pm 9,62
SOD 100 U/mL	52,32 \pm 3,98	66,14 \pm 31,22	59,45 \pm 5,91

Integridade de membrana acrossomal (iAc), alto potencial de membrana mitocondrial (aPMM), integridade de membrana plasmática (iMP).

Tabela 2. Porcentagem (média \pm dp) dos parâmetros cinéticos de espermatozoides bovinos obtidos na cauda do epidídimo de touros Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, acrescido ou não de antioxidantes enzimáticos

Tratamentos	MT (%)	MP (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Controle	68,94 \pm 14,64	22,64 \pm 9,92	42,63 \pm 8,69	18,09 \pm 5,77	24,66 \pm 6,46	41,63 \pm 6,69 ^a	72,36 \pm 6,10	57,23 \pm 4,48 ^a	2,49 \pm 0,23	9,97 \pm 0,98
CAT 50 U/mL	68,87 \pm 13,93	24,56 \pm 6,98	45,36 \pm 10,85	18,74 \pm 5,97	25,75 \pm 7,05	40,53 \pm 4,39 ^a	71,87 \pm 3,78	56,25 \pm 3,52 ^a	2,54 \pm 0,31	10,11 \pm 1,28
CAT 100 U/mL	70,18 \pm 11,03	25,59 \pm 8,07	45,40 \pm 12,96	19,30 \pm 8,28	26,13 \pm 9,29	41,31 \pm 5,43 ^a	72,56 \pm 4,84	56,74 \pm 3,99 ^a	2,51 \pm 0,38	10,26 \pm 1,26
SOD 50 U/mL	64,71 \pm 10,98	21,55 \pm 8,41	41,76 \pm 7,99	15,61 \pm 5,05	21,97 \pm 5,78	36,53 \pm 5,61 ^{ab}	69,99 \pm 5,28	51,92 \pm 4,55 ^{ab}	2,53 \pm 0,30	9,95 \pm 1,04
SOD 100 U/mL	64,10 \pm 6,78	18,85 \pm 8,14	40,64 \pm 8,05	14,12 \pm 5,64	20,61 \pm 6,45	33,69 \pm 8,15 ^b	66,78 \pm 6,64	49,82 \pm 7,47 ^b	2,53 \pm 0,30	9,66 \pm 1,37

Motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m s}^{-1}$), velocidade média do trajeto (VAP, $\mu\text{m s}^{-1}$), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), oscilação (WOB, %), amplitude de deslocamento da cabeça (ALH, μm) e frequência do batimento de flagelo (BCF, Hz).

Tabela 3. Avaliação da taxa de clivagem através de fertilização *in vitro* em oócitos obtidos em matadouros, e fertilizados com espermatozoides obtidos na cauda do epidídimo de touros da raça Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, acrescido ou não de antioxidantes enzimáticos

Grupos	Fertilidade		Total	Fertilidade (%)
	Clivagem	Não Clivagem		
CONTROLE	74	55	129	57,36
CAT 50U	69	60	129	53,49
CAT 100U	60	69	129	46,51
SOD 50U	65	64	129	50,39
SOD 100U	69	60	129	53,49
Total	337	308	645	52,25

Tabela 4. Avaliação da taxa de blastocistos em oócitos clivados através de fertilização *in vitro* em oócitos obtidos em matadouros, e fertilizados com espermatozoides obtidos na cauda do epidídimo de touros da raça Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, acrescido ou não de antioxidantes enzimáticos

Grupos	Viabilidade em clivados		Total	Viabilidade (%)
	Blastocisto	Estacionário		
CONTROLE	52	22	74	70,27 ^a
CAT 50U	44	25	69	63,77 ^a
CAT 100U	40	20	60	66,67 ^a
SOD 50U	42	23	65	64,62 ^a
SOD 100U	40	29	69	57,97 ^b
Total	218	119	337	64,66

Diferentes letras na coluna indicam $P < 0,001$.

Tabela 5. Avaliação da taxa de blastocistos através de fertilização *in vitro* em oócitos obtidos em matadouros, e fertilizados com espermatozoides obtidos na cauda do epidídimo de touros da raça Nelore, pós-criopreservação em tris-gema, acrescido ou não de antioxidantes enzimáticos

Grupos	Viabilidade em oócitos		Total	Viabilidade (%)
	Blastocisto	Estacionário		
CONTROLE	52	77	129	40,31
CAT 50U	44	85	129	34,11
CAT 100U	40	89	129	31,01
SOD 50U	42	87	129	32,56
SOD 100U	40	89	129	31,01
Total	218	427	645	33,80