

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ANTIOXIDANTES NA VIABILIDADE DO SÊMEN EQUINO
CONGELADO E RESFRIADO**

Rodrigo Arruda de Oliveira
Orientadora: Dr^a. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos

GOIÂNIA
2011

RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA

**ANTIOXIDANTES NA VIABILIDADE DO SÊMEN EQUINO
CONGELADO E REFRIGERADO**

Tese apresentada para obtenção do grau
de Doutor em Ciência Animal junto à
Escola de Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás.
Nível: Doutorado

Área de concentração:
Produção Animal

Linha de Pesquisa:
Biotecnologia e Eficiência Reprodutiva Animal

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia G. Meirinhos UFG/GO

Comitê de Orientação:
Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho UFG/GO
Prof. Dr. Pedrinho Paes Teixeira UFG/GO

GOIÂNIA
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

O482a Oliveira, Rodrigo Arruda de.
Antioxidantes na viabilidade do sêmen equino congelado e resfriado [manuscrito] / Rodrigo Arruda de Oliveira. - 2011.
100 f. : figs., tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.
Bibliografia.

1. Antioxidantes – Sêmen 2. Equinos. I. Título.

CDU:619:636.1

RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA

Tese defendida e aprovada em **18/04/2011** pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



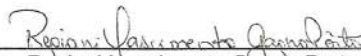
Profa. Dra. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos
(ORIENTADOR (A))



Prof. Dr. Klayto José Gonçalves dos Santos – UEG/São Luis de Montes
Belos-GO



Profa. Dra. Karen Martins Leão – IFECT/GO



Profa. Dra. Regiani Nascimento Gagno Porto (memória)



Profa. Dra. Ana Paula Iglésias Santin – EV/UFG

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora, pelas bênçãos diárias concedidas na minha vida, pela saúde e determinação, muito obrigado, Senhor.

Aos meus pais, Minervino Francisco de Oliveira e Goiany Arruda de Oliveira, por acreditaram no meu projeto de vida e me apoiarem incondicionalmente em todos os momentos, compreendendo a minha ausência em várias situações. E pela educação e valores que me ensinaram.

Aos meus irmãos, Guilherme e Thaís, pelo apoio diário e compreensão nos momentos que eu não estava presente. À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Lúcia Gambarini, que além de ensinamentos e real exemplo de orientação, foi uma verdadeira amiga. Obrigado por todos os conselhos, atenção e paciência!

À Ana Carolina, pela paciência, amor, dedicação, correções e aulas preparadas, não tenho nem palavras para agradecer.

A todos os meus estagiários: Svetlana, Aline Mamede, Rachel e Sabino, essa vitória é de vocês, aliás, foram inúmeras noites sem dormir! Valeu turminha!

À empresa TKCongelação por ceder a máquina de congelamento. À Biotech-Botucatu e Nutricell, por cederem diferentes diluentes utilizados nos experimentos. À Prof^a Dr^a Emília, representando o Instituto de Química, pela disponibilidade do osmômetro; e Dr^a Margot Alves, Embrapa/Cenargen/DF, por ceder o aparelho de análise computadorizada e ao José Carvalho pelo auxílio nas análises.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Viu, pela amizade, ensinamentos, delineamento e análises estatísticas.

Aos Professores de Parasitologia: Guido, Andréia e Lígia, por permitirem a utilização do microscópio de fluorescência.

Ao Bruno (Índio) pela amizade e hospedagem em Jataí. Valeu, meu amigo!

Ao Haras OP, Tree Ranch, Rancho TS, Rancho RS, Haras TGS e Haras Luar, por cederem os animais utilizados nos experimentos, e aos seus respectivos funcionários que não mediram esforços nas colheitas.

A todos os Professores e Colegas do curso de pós-graduação.

E por fim, aos meus nobres amigos, que me fizeram chegar até aqui: Os cavalos!

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 A célula espermática.....	4
2.2 Criopreservação	5
2.2.1 Lesões espermáticas causadas pela criopreservação.....	6
2.3 Refrigeração do sêmen.....	8
2.4 Efeito do garanhão na congelabilidade e refrigeração do sêmen.....	12
2.5 Espécies reativas de oxigênio.....	14
2.6 Antioxidantes.....	19
2.6.1 Glutathione.....	22
2.6.2 Cisteína.....	23
3 REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 2 – ADIÇÃO DE GLUTATHIONE AO MEIO CRIOPROTETOR PARA SÊMEN EQUINO FRESCO E REFRIGERADO A 16°C POR 24H EM DIFERENTES PROTOCOLOS DE CONGELAMENTO.....	31
RESUMO.....	31
CHAPTER 2 – ADITION OF GLUTATHIONE TO THE DILUENT FOR FRESH AND COOLED SEMEN AT 16°C FOR 24H IN DIFFERENT PROTOCOLS.....	32
ABSTRACT.....	32
1 INTRODUÇÃO.....	33
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.1 Local e período experimental.....	36
2.2 Colheita e processamento de material.....	36
2.3 Adição de antioxidante e congelamento das amostras.....	38
2.4 Análises pós-descongelamento.....	40
2.4.1 Avaliação computadorizada de características do movimento espermático.....	40
2.5 Análise estatística.....	40
3 RESULTADOS.....	42

3.1 Experimento I.....	42
3.2 Experimento II.....	45
4 DISCUSSÃO.....	48
5 CONCLUSÕES.....	58
6 REFERÊNCIAS.....	59
CAPÍTULO 3 – REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO A 16°C POR 36H COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA E CISTEÍNA.....	64
RESUMO.....	64
CAPTER 3 – ADDITION OF GLUTATHIONE AND CYSTEINE TO CHILLED STALLION SEMEN AT 16°C DURING 36 HOURS.....	65
ABSTRACT.....	65
1 INTRODUÇÃO.....	66
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1 Local e período experimental.....	69
2.2 Colheita e processamento de material.....	69
2.3 Adição do antioxidante e refrigeração das amostras.....	69
2.4 Análises em diferentes momentos de refrigeração.....	70
2.4.1 Motilidade e vigor.....	70
2.4.2 Integridade de membrana plasmática.....	71
2.4.3 Integridade de membrana acrossomal.....	71
2.5 Análise estatística.....	72
3 RESULTADOS.....	73
4 DISCUSSÃO.....	77
5 CONCLUSÃO.....	82
6 REFERÊNCIAS.....	83
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
ANEXO I.....	88
ANEXO II.....	89
ANEXO III.....	90

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Motilidade progressiva (%) em relação aos momentos de avaliação.....	74
FIGURA 2 - Vigor espermático em relação aos momentos de avaliação.....	74
FIGURA 3 - Integridade de membrana plasmática (%) em relação aos momentos de avaliação.....	75
FIGURA 4 - Espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (%) em relação aos momentos de avaliação.....	75
FIGURA 5 - Espermatozóides vivos com acrossoma íntegro (%) em relação aos momentos de avaliação.....	76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Resultados das análises pré-congelamento do sêmen fresco e após refrigeração passiva por 24h.....	44
TABELA 2 - Resultados percentuais das análises pós-descongelamento do Experimento I, referentes a motilidade subjetiva (MOT) e dados da avaliação computadorizada: motilidade progressiva (MOTPROG), retilinearidade (RETIL) e linearidade (LINEA).....	45
TABELA 3 - Resultados das análises pós-descongelamento do Experimento I, referentes ao vigor subjetivo (0-5), velocidade média da trajetória (VEMEDPER- $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VELPROG- $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH- $\mu\text{m/s}$) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF-Hz).....	45
TABELA 4 - Resultados percentuais das análises pós-descongelamento do Experimento I, referentes à integridade de membrana plasmática e acrossomal..	45
TABELA 5 - Resultados das análises pós-descongelamento referentes à motilidade progressiva e vigor pós-descongelamento, Experimento II.....	46
TABELA 6 - Resultados das análises pós-descongelamento referentes a integridade de membrana plasmática acrossomal, Experimento II.....	47
CAPÍTULO 3	
TABELA 1 - Efeito dos antioxidantes sobre as características seminais durante 36 horas de refrigeração a 16°C.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALH	Amplitude lateral de cabeça
BCF	Frequência de batimentos
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
cm	Centímetros
DNA	Ácido desoxirribunocléico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
g	Giros
GSH	Forma reduzida da glutathione
GSSG	Forma oxidada da glutathione
h	Horas
HO	Teste hiposmótico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IA	Inseminação artificial
INTMEMB	Integridade funcional de membrana plasmática
LIN	Linearidade
min	Minutos
mM	milimol
MT	Motilidade total
MP	Motilidade progressiva
RG	Sêmen refrigerado congelado de forma manual
RM	Sêmen refrigerado congelado de forma automática
SH	Grupamento sulfidrila
STR	Retilinearidade
TTM	Tratamento
VAP	Velocidade de trajeto
VCL	Velocidade curvilínea
VIVOS	Integridade estrutural de membrana plasmática
VIVOINT	Espermatozóides vivos com acrossoma íntegro
VSL	Velocidade retilínea
μL	Microlitros

RESUMO GERAL

Na equinocultura mundial é cada vez maior a utilização do sêmen congelado e refrigerado devido a recente liberação do seu uso por grande parte das associações de criadores. Entretanto, a fertilidade do sêmen congelado ainda é baixa e isto dificulta a sua utilização em larga escala. Objetivou-se avaliar o efeito *in vitro* da adição de glutathione em cinco concentrações sobre espermatozoides de 12 garanhões em diferentes protocolos de congelamento, sendo Experimento I (EI): congelamento automatizado imediatamente pós-colheita e Experimento II (EII): congelamento automatizado (RM) e manual (RG) após refrigeração passiva por 24h a 16°C. As variáveis avaliadas foram motilidade total e progressiva, vigor, integridade das membranas plasmática e acrossomal. A adição de glutathione na concentração de 2,5mM ao meio de congelamento preserva a motilidade total, incrementa significativamente a motilidade progressiva e a integridade de membrana plasmática, tanto para sêmen congelado imediatamente pós-colheita quanto para o refrigerado e congelado de forma manual. Concentrações superiores a 2,5mM foram deletérias aos espermatozoides nos diferentes protocolos de congelamento, com ou sem refrigeração passiva. No capítulo 3 objetivou-se avaliar o efeito *in vitro* da adição de cisteína e glutathione em sete tratamentos, sobre espermatozoides de 12 garanhões em protocolo de refrigeração passiva a 16°C por 36h. As variáveis avaliadas foram motilidade total e progressiva, vigor e integridade das membranas plasmática e acrossomal em sete momentos diferentes (0, 6, 12, 18, 24, 30 e 36h). Para discussão dos dados foram levados em consideração somente os valores dos momentos 1, 3, 5 e 7 (0, 12, 24 e 36h). A concentração de cisteína 1,0mM mostrou-se mais eficiente para proteção da célula espermática no sistema comercial de refrigeração passiva a 16°C por 36h, com valores maiores de motilidade e integridade de membrana.

Palavras chave: Cisteína, espermatozoide, Garanhão, glutathione, recursos genéticos

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A equinocultura brasileira vem se desenvolvendo ativamente e certos segmentos, como o esporte, têm representatividade internacional tanto pela qualidade dos animais quanto dos cavaleiros. O turismo rural vem ganhando muitos adeptos e está presente em diversas propriedades históricas e fazendas, aumentando as opções de renda com a utilização do cavalo.

Os equinos integram o conceito de preservação ambiental e de qualidade de vida, sendo parceiros importantes para programas ligados a temas ecológicos, turismo rural e de valorização da vida no campo, além da importância do equino como terapia, no caso da equoterapia.

A Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, em parceria com o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada/ESALQ, criou a Comissão Nacional do Cavalo, que teve como meta preparar um estudo sobre o agronegócio equino dimensionando cientificamente o porte do setor, o que está auxiliando na formação de estratégias viáveis para o desenvolvimento da equinocultura brasileira.

De acordo com LIMA et al. (2006), somente entre os animais registrados, são 300 mil Mangalarga Marchador; 278 mil Quarto-de-Milha; 197 mil Crioulo, 186 mil Mangalarga, 88 mil Campolina, 80 mil Árabe, 30 mil Puro Sangue Inglês e 25 mil Appaloosa, entre outros, e quase cinco milhões de animais sem raça definida. Este é o tamanho da equinocultura que forma no Brasil uma importante cadeia do agronegócio, com forte interrelação com setores ligados ao lazer, cultura e turismo. Isso sem considerar os animais sem registro e os equinos de trabalho das inúmeras fazendas de gado espalhadas pelo país, colocando o Brasil como o terceiro maior rebanho do mundo, com 5,9 milhões de animais, atrás apenas da China e México.

Esses números provam o poder que os equinos representam para a economia nacional, sendo impossível imaginar que somente indivíduos de alto poder econômico desenvolvam essa atividade produtiva. O uso do cavalo ocupa diretamente mais de 640 mil pessoas no país, gera de forma indireta 3,2

milhões de empregos e movimentação por ano 7,5 bilhões de reais na economia nacional.

Na equinocultura mundial é cada vez maior a utilização do sêmen congelado devido a recente liberação do seu uso por grande parte das associações de criadores. Entretanto, a fertilidade do sêmen congelado ainda é baixa e isto dificulta a sua utilização em larga escala (VIDAMENT, 2005; MILLER, 2008). As taxas de concepção por estro utilizando essa técnica variam bastante, sendo que em alguns garanhões chegam a oscilar entre 25 e 40%. Adicionalmente sabe-se que boa parte dos garanhões não responde bem a essa biotécnica, o que faz com que o número de pesquisas nesse sentido venha aumentando cada vez mais, com o intuito de superar a variação individual (VIDAMENT, 2005).

A utilização da criopreservação de sêmen iniciou-se há aproximadamente 60 anos com a descoberta do glicerol como crioprotetor. Essa descoberta permitiu que os espermatozóides fossem congelados, armazenados por tempo indeterminado e usados com sucesso na inseminação artificial. Felizmente os pioneiros desta biotécnica escolheram trabalhar com espermatozóides bovinos e de galos, pois se tivessem escolhido outras espécies, como é o caso dos eqüinos, teriam encontrado uma série de problemas espécie-específicos que até hoje não foram solucionados.

Além do melhoramento genético, o congelamento de sêmen serve como banco de reserva genética para animais de alto padrão racial e comercial, propicia maior intercâmbio entre criatórios das mais variadas regiões e países e seleciona indivíduos e linhagens quanto à sua fertilidade e congelabilidade. A criopreservação também contribui para minimizar perdas econômicas advindas da morte de reprodutores de alto valor comercial ou que participem de programas de revitalização de raças, para a preservação contra a extinção de raças nativas e conservação de espécies ameaçadas (WATSON, 2000).

Várias técnicas têm sido testadas para a criopreservação espermática utilizando diferentes velocidades e meios de centrifugação; curvas e meios de congelamento; crioprotetores e suas concentrações; inclusão de substâncias ao meio crioprotetor, como antioxidantes diversos; bem como protocolos de descongelamento. Embora vários centros de pesquisa tenham se envolvido em

estudos nesta área, ainda não há uma metodologia de congelamento universalmente aceita para esta espécie.

Desta forma os objetivos do presente experimento foram avaliar o efeito *in vitro* da adição de antioxidantes em diferentes concentrações, protocolos de congelamento e refrigeração do sêmen equino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A célula espermática

O espermatozóide é uma célula alongada, formada por duas regiões altamente especializadas: a cabeça, na qual está contido o DNA e o acrossomo, vital para a interação espermatozóide-oócito; e o flagelo, envolvido com a motilidade da célula. Neste, encontra-se a peça intermediária contendo as mitocôndrias relacionadas com a produção de energia. A cabeça do espermatozóide, além do núcleo, contém pequena quantidade de citoplasma e, no seu extremo apical, o acrossomo, uma vesícula contendo enzimas necessárias para a penetração na zona pelúcida (GARNER & HAFEZ, 1995).

Toda a característica estrutural especializada do espermatozóide está voltada para sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no seu núcleo para o oócito, onde a união dos pronúcleos masculino e feminino ocorre, produzindo o zigoto. Desta forma, a função principal da cabeça do espermatozóide é contribuir com uma série haplóide de cromossomos para o oócito, enquanto a do flagelo é promover a motilidade da célula para permitir sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e a penetração através da zona pelúcida do oócito (GARNER & HAFEZ, 1995).

A membrana plasmática tem permeabilidade seletiva e atua como uma barreira, mantendo, assim, diferenças de composição intra e extra-celular. Danos nesta estrutura podem levar à perda da homeostase com posterior morte celular. Portanto, a integridade da membrana plasmática exerce papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e na manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS & GRAHAM, 1992).

Fatores externos às células espermáticas, tais como alterações na composição, pH, temperatura e osmolaridade do meio que as circunda, podem provocar alterações irreversíveis em suas membranas limitando a função fertilizante dos espermatozoides (AMANN & PICKETT, 1987).

2.2 Criopreservação

Para que o espermatozóide criopreservado possa fertilizar o oócito, ele deve manter alguns atributos gerais, como: metabolismo para produção de energia; motilidade progressiva; viabilidade das enzimas localizadas no acrossomo e proteínas na membrana plasmática, importantes para a sobrevivência do espermatozóide dentro do trato reprodutivo feminino e para a ligação do mesmo com a membrana plasmática do oócito para a fertilização. A destruição de componentes da célula espermática, associada com uma ou mais dessas funções, reduzirá a fertilidade. Por exemplo, um espermatozóide móvel nem sempre é fértil; espermatozóides móveis usualmente têm adequada produção de energia, mas outro importante aspecto pode ter sido alterado (AMANN & PICKETT, 1987).

O principal solvente biológico responsável pelo transporte de nutrientes e substâncias químicas é a água que, em seu estado puro, forma cristais a 0°C, e quando contém íons e outras substâncias em solução, congela a temperaturas mais baixas, dependendo da concentração e natureza desses componentes (MAZUR, 1984).

Quando uma suspensão de espermatozóides é resfriada abaixo de 0°C, cristais de gelo extracelulares começam a se formar, resultando em aumento da concentração de sais no líquido extracelular. A proporção de água cristalizada como gelo e conseqüentemente a osmolaridade da solução remanescente dependem da temperatura. Inicialmente a água do interior do espermatozóide não se congela, mas é resfriada abaixo do ponto de congelamento. A água se move do interior do espermatozóide para o meio extracelular, desidratando progressivamente a célula. Se a velocidade de congelamento é muito lenta, a alta concentração de sais intracelulares causada pela desidratação pode danificar o espermatozóide; se a taxa de congelamento for muito rápida, cristais de gelo intracelular podem se formar. A taxa de congelamento adequada é um equilíbrio entre esses fatores (MAZUR, 1984).

Quando o volume celular atinge um mínimo crítico, a bicamada de fosfolípidos da membrana celular fica muito comprimida e sua estrutura se quebra, alterando as funções de transporte e proteção da membrana não podem ser mantidas. Ao mesmo tempo, rupturas da membrana promovem uma

ponte para entrada do gelo extracelular para o interior da célula (AMANN & PICKETT, 1987).

Assim, os danos causados aos tecidos durante os processos de congelamento e descongelamento são devidos a: formação de cristais de gelo intracelulares, que afetam a estrutura da célula; concentração de soluto resultante do processo de desidratação, que ocorre durante o congelamento tanto no meio extra como intracelular e interação entre esses dois fatores (AMANN & PICKETT, 1987).

O mecanismo de ação dos crioprotetores baseia-se principalmente na promoção da redução do ponto de solidificação da solução no congelamento, promovendo um maior tempo para a desidratação da célula e diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares (MAZUR, 1984).

Uma segunda função do crioprotetor é sua interação com a membrana celular exercendo ação estabilizadora durante as mudanças do estado líquido para o sólido, e vice-versa, no descongelamento. Outra ação dos crioprotetores é a de diminuir os efeitos das altas concentrações osmóticas durante a desidratação celular. Muitas moléculas se dissolvem na mistura de crioprotetor e na água, tornando-se menos lesivas do que quando dissolvidas em altas concentrações em um líquido na ausência do crioprotetor (MAZUR, 1984).

2.2.1 Lesões espermáticas causadas pela criopreservação

O espermatozóide tem uma diversidade de atributos funcionais altamente diferenciados regionalmente que devem ser mantidos até a fertilização. A criopreservação ideal deve ter o compromisso de manter o maior número possível de células viáveis e a integridade de diferentes estruturas espermáticas (WATSON, 2000).

O resfriamento leva a célula a um estado de quiescência, reduz o metabolismo e proporciona diminuição nos gastos energéticos e na produção de catabólitos tóxicos, contribuindo para preservação celular. Da mesma maneira que o congelamento pode diminuir ou paralisar algumas reações bioquímicas celulares, ele pode também acelerar outras, levando a danos ou mesmo morte celular (WATSON, 2000).

O termo estresse térmico, ou choque térmico, define um conjunto de alterações ocorridas nos espermatozóides dos mamíferos quando resfriados da temperatura corpórea até temperaturas próximas a 5°C, tendo como consequência um decréscimo irreversível da motilidade espermática, mudanças bioquímicas e na função espermática (AMANN & PICKETT, 1987).

A redução da temperatura de 37°C a valores próximos de 4-5°C pode levar ao rearranjo de alguns fosfolípidos semelhantes dentro da bicamada da membrana plasmática, que podem agrupar-se e assumir outras configurações. Com este rearranjo, as propriedades biológicas básicas da membrana plasmática, como permeabilidade seletiva e difusão lateral de proteínas, não são mantidas, alterando a sua função (AMANN & PICKETT, 1987).

Os principais fatores que afetam a fluidez característica da membrana plasmática são a composição relativa entre fosfolípidios e colesterol e a temperatura à qual a membrana é exposta. Com a queda da temperatura, os lipídios passam pela transição de estado líquido para gelatinoso. Sendo assim, as cadeias de ácidos graxos organizam-se em um modelo paralelo, ficando impossibilitadas de se mover aleatoriamente. Isso irá resultar na formação de domínios cristalinos, com apenas pequenas regiões de lipídios no estado líquido, onde ficam aderidas as proteínas, produzindo uma estrutura rígida. Deste modo, áreas da membrana plasmática tornam-se fracas, sujeitas a rupturas e permeáveis a íons, como o cálcio (HAMMERSTEDT et al., 1990).

A regulação do influxo de cálcio é claramente afetada pelo resfriamento, sendo, indiscutivelmente, uma das mais graves alterações em termos de função espermática, e em alguns casos, esta alteração pode ser incompatível com a viabilidade espermática. A entrada de cálcio na célula durante o resfriamento, mimetizando o que ocorre fisiologicamente durante a capacitação, contribui para o início das reações fusogênicas entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa (DOBRINSKI et al., 1997). WATSON (2000) relatou a existência de grande similaridade entre os danos verificados na membrana plasmática durante o congelamento e as alterações após a reação acrossomal.

A formação de cristais de gelo durante o congelamento, descrita por MAZUR (1984), leva ao aumento da concentração de sais na fração não congelada, que pode ser prejudicial ao espermatozóide. Altas concentrações

de sais podem desidratar a célula espermática, deformando-a, provocando danos à estrutura da membrana, desestruturação e desnaturação das proteínas. Em consequência, os espermatozoides sofrem danos irreversíveis, caracterizados por movimentos anormais (circular ou retrógrado), rápida perda da motilidade, danos ao acrossomo e membrana plasmática, redução do metabolismo e perda de componentes intracelulares (AMANN & PICKETT, 1987).

Como o espermatozoide é congelado na velocidade de -25°C a $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$, a água intracelular não congelada se difunde para fora do espermatozoide devido ao aumento da concentração de solutos na fração de água não congelada extracelular, causando desidratação da célula (MAZUR, 1984).

Com o declínio constante da temperatura, as células ficam expostas à temperatura de congelamento e, com isto, os espermatozoides são submetidos a alterações de osmolaridade do meio que os circunda. A água presente no meio extracelular encontra-se sob a forma de solução. Com o congelamento de parte desta água, a saturação de solutos aumenta, tornando hipertônico o meio externo. Neste momento, para que o equilíbrio osmótico seja atingido, ocorre efluxo de água da célula para o meio externo. Esta tentativa da célula de equilibrar-se com o meio que a circunda pode conduzi-la a um efeito deletério devido à grande desidratação e à exposição a um meio extremamente saturado, denominado efeito de solução, considerado um dos pontos críticos no processo de congelamento das células espermáticas (MAZUR, 1984).

No descongelamento, os cristais de gelo extracelulares se descongelam liberando água que dilui as concentrações de sais extracelulares e a água se difunde lentamente para o interior da célula. Este processo restaura o volume celular inicial e dilui as concentrações celulares de soluto aos valores originais (MAZUR, 1984; AMANN & PICKETT, 1987).

2.3 Refrigeração de sêmen

A criação de cavalos no Brasil está em destaque no cenário nacional, sendo o país que possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo. Desta forma, os criadores de cavalos buscam alternativas para melhorar os índices

reprodutivos e aumentar o ganho genético. Atualmente a utilização de biotécnicas da reprodução, como a inseminação artificial (IA) com sêmen fresco, refrigerado e congelado e a transferência de embriões, está ganhando espaço no manejo reprodutivo equino. O congelamento, a refrigeração e o transporte de sêmen possibilitam a utilização de material genético sem prejuízos para a reprodução. Os países que mais realizam IA com sêmen resfriado transportado são os Estados Unidos e o Brasil. Entre vários aspectos positivos do uso desta biotecnologia, destaca-se a possibilidade de se proceder a colheita do sêmen em uma propriedade e enviá-lo para inseminar éguas em locais diferentes e distantes. Este procedimento, além de seguro e mais barato, evita riscos associados com transporte tanto de éguas como do garanhão (AVANZI, et al., 2006). Entretanto, a fertilidade do sêmen refrigerado é mantida por 24-48 horas. Após esse tempo, a taxa de prenhez diminui drasticamente (AURICH, 2008).

Existem algumas diferenças quanto à estrutura da membrana e metabolismo do espermatozóide de acordo com a temperatura na qual o mesmo está mantido. Os lipídeos da membrana espermática estão na fase líquida a 22°C e em gel a 4°C e esta mudança pode acarretar danos à célula espermática. O metabolismo do espermatozóide a 21°C é de 10 a 20% do metabolismo a 37°C, e a 4°C é de apenas 2 a 7%. A via metabólica a 37°C é aeróbia, assim como a 15°C; já, a 4°C a via de metabolização é anaeróbia (VIDAMENT et al., 2000).

PROVINCE et al. (1985) verificaram que o sêmen armazenado a 20°C e 15°C apresentou valores superiores de motilidade espermática do que a 10°C ou 5°C por até 36h de refrigeração. BATELLIER et al. (2001) obtiveram maior longevidade espermática e melhores índices de prenhez quando o sêmen foi armazenado a 15°C do que a 5°C, por 24h.

Segundo BATELLIER et al. (2001), o armazenamento a 15°C pode prevenir os danos à membrana plasmática causados pelo choque frio, principalmente para o sêmen de garanhões que não respondem bem à refrigeração.

A preservação do sêmen por pelo menos 24h é importante para que seja transportado e utilizado na IA. O armazenamento por longos períodos pode desencadear processos bioquímicos que podem comprometer a fertilidade,

como a capacitação espermática prematura, instabilidade nuclear, perda de componentes intracelulares e peroxidação lipídica das membranas espermáticas (POMMER et al., 2002).

Uma das razões para a redução da fertilidade durante a estocagem do sêmen é a peroxidação de lipídios na presença de íons de oxigênio. A membrana do espermatozóide contém grandes quantidades de ácidos graxos insaturados particularmente susceptíveis à peroxidação, com subsequente perda da integridade da membrana e função celular, além da redução da motilidade espermática (AURICH et al., 1997).

O manuseio do sêmen durante o processo de refrigeração e transporte até o local de realização da inseminação artificial deve ser feito de forma a manter a capacidade fecundante dos espermatozóides, sendo que, alterações que ocorram durante a colheita e o armazenamento do sêmen até o seu encontro com o oócito no trato reprodutor feminino podem afetar o processo de fecundação. Então, para a obtenção de bons resultados na inseminação artificial, os espermatozóides devem apresentar integridade funcional e estrutural até o momento da fertilização (AMANN & GRAHAM, 1992).

O uso de sêmen equino refrigerado tem aumentado muito nos últimos anos, resultado da sua aceitação entre as associações de criadores. Esta técnica facilita o manejo, já que não há necessidade da presença da égua e do garanhão no mesmo local (SQUIRES et al., 1998). O armazenamento do sêmen diluído em baixas temperaturas prolonga a viabilidade espermática pela redução do consumo de energia e da formação de subprodutos (ALTHOUSE et al., 1998).

A tecnologia de sêmen refrigerado é estudada com o intuito de manter o potencial fertilizante do sêmen equino por vários dias. Na verdade, quanto mais tempo o potencial fertilizante do sêmen refrigerado puder ser estendido, mais fácil será o uso do sêmen transportado (BATELLIER et al., 2001).

Entretanto, apesar da difusão do seu uso, há uma variação considerável nas taxas de fertilidade do sêmen equino refrigerado transportado. Os fatores que podem afetar essas taxas incluem a fertilidade intrínseca do garanhão e da égua, a composição do diluente, a curva de refrigeração e temperatura de armazenamento do sêmen diluído, a dose inseminante (número de espermatozóides móveis), a proximidade da ovulação e o tempo de

armazenamento *in vitro*. À medida que o tempo de armazenamento aumenta a fertilidade do sêmen diminui (PICKETT, 1995).

A refrigeração do sêmen pode ser feita em sistemas ativos ou passivos. Os sistemas ativos, embora possuam taxas de refrigeração pré-determinadas, são caros e de pouca utilidade prática em condições de campo. Já os passivos possuem a vantagem de serem mais baratos, porém possuem taxa de refrigeração dependente de fatores como a temperatura ambiente, volume e temperatura inicial da amostra (VALLE et al., 1999).

O sistema passivo de refrigeração do sêmen é o mais utilizado para equinos, sendo feito em dispositivos (*containers*) de refrigeração que devem atender às seguintes exigências: completo isolamento isotérmico do meio exterior, obtenção de taxa de refrigeração lenta (ideal = $-0,33^{\circ}\text{C}/\text{min}$), manutenção da temperatura pelo maior tempo possível após a estabilização, proteção do sêmen, estrutura forte que permita o uso de diferentes meios de transportes, ser barato, leve e de fácil manuseio (SILVA FILHO et al, 1994).

Existem diversos modelos de refrigeração nacionais e importados, com diferentes taxas de refrigeração, temperatura final e tempo máximo de armazenamento. Dentre os internacionais pode-se citar: Equitainer I[®], Equitainer II[®], ExpectaFoal[®], Bio-Flite[®], Lane STS[®], Equine Express[®], Foal Flight[®], Celle[®], Sarstedt[®], Salsbro Box[®].

O Equitainer[®], desenvolvido por DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984), é o mais conhecido; sua taxa de refrigeração inicial é de aproximadamente $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, e em 10h atinge a temperatura final de aproximadamente 5°C , e mantendo por 30 a 50h. De acordo com o fabricante, seu tempo máximo de armazenamento é de aproximadamente 72h. Apesar de ser muito resistente e poder ser reutilizado, seu alto custo de aquisição e a necessidade de retorno ao haras de origem podem dificultar a sua utilização (BRINSKO et al., 2000).

Modelos de dispositivos de refrigeração nacionais estão com aceitação crescente devido ao menor preço e maior facilidade de aquisição. O Botu-Box[®] e Max-Sêmen Express[®] apresentam temperatura final de aproximadamente 15°C e tempo de armazenamento de aproximadamente 24h, enquanto o Botutainer[®] tem temperatura final de aproximadamente 5°C e tempo máximo de armazenamento de 48h.

MACHADO et al. (2002) realizaram estudo com objetivo de testar dois sistemas de refrigeração passiva compostos de dois isopores, um pequeno (15X11cm) dentro de um maior (25X16cm), com duas fontes de gelo diferentes (gelo reciclável gelatinoso *versus* gelo derivado de polímero *Ice Foam*), comparando-os com o dispositivo Equine Express®. Esse estudo comprovou que o primeiro dispositivo realizou uma curva de refrigeração adequada de -0,02°C/min, sendo eficaz na manutenção da temperatura (16°C por período superior a 24h), e da qualidade espermática por análise computadorizada (motilidade total e progressiva), bem como a integridade de membrana plasmática por fluorescência quando comparado a outro sistema. Com isso, demonstrou-se que esse sistema foi eficiente, além de ser uma alternativa economicamente mais viável para o transporte de sêmen equino refrigerado que os sistemas importados.

A preservação do sêmen é um manejo importante na reprodução de equinos. A preservação da motilidade e da fertilidade no sêmen refrigerado é fundamental para possibilitar o emprego da inseminação artificial nesta espécie. A melhoria da preservação do sêmen refrigerado tem sido direcionada ao uso de diluidores, assim como a adição de componentes específicos para manter a integridade da membrana, prevenir o estresse oxidativo e preservar a motilidade espermática (SAMPER, 2000).

2.4 Efeito do garanhão na congelabilidade e refrigeração do sêmen

Dentre os animais das espécies domésticas o cavalo é o que mais se assemelha aos humanos no que diz respeito à clínica da reprodução. Os cruzamentos raramente incluem a fertilidade como um critério de seleção, isto acarreta um número significativo de reprodutores com baixo desempenho reprodutivo ou subfêrteis (LOOMIS, 2005).

A seleção de reprodutores geralmente é feita pelo padrão racial e desempenho atlético, o que leva à utilização de garanhões subfêrteis. Apesar das características reprodutivas terem herdabilidade moderada, a utilização destes garanhões pode perpetuar na população através de genes particularmente indesejáveis sob o aspecto reprodutivo (AMAN & GRAHAM, 1992).

Com a finalidade de aumentar o desempenho reprodutivo, a utilização de métodos avançados para o processamento e seleção do sêmen de garanhões é uma boa ferramenta para o uso do sêmen de baixa qualidade ou para obter espermatozóides para programas de reprodução assistida (LOOMIS, 2005).

A congelabilidade do sêmen do garanhão é definida como o número de ejaculados selecionados pelo número total de ejaculados congelados. O ejaculado selecionado é aquele que apresenta uma motilidade progressiva $\geq 35\%$ pós-descongelamento (VIDAMENT et al., 1997).

Avaliando a congelabilidade de 427 garanhões, VIDAMENT et al. (1997) encontraram somente 20% apresentando resposta ao congelamento. A congelabilidade não varia somente entre garanhões, mas também entre os ejaculados do mesmo garanhão. Os mecanismos que diferenciam um garanhão do outro quanto à resposta ao congelamento ainda não foram elucidados. Poderiam ser ou não de origem genética, e se fossem, a seleção genética seria um aspecto para seleção de garanhões que apresentassem boa resposta ao congelamento (SIEME et al., 2008).

Protocolos de diferentes países, métodos de congelamento e instruções para inseminação com sêmen congelado foram comparados por SIEME et al. (2008), que concluíram não haver um padrão, demonstrado por inúmeras diferenças no processamento do sêmen para criopreservação.

Variações individuais entre os garanhões, como na composição do plasma seminal e das membranas espermáticas, podem interferir na manutenção da motilidade espermática e integridade da membrana plasmática durante o processo de refrigeração, podendo ocasionar redução na taxa de fertilidade (BATELLIER et al., 2001; KARESKOSKI et al., 2006).

A influência do plasma seminal heterólogo na motilidade espermática no sêmen refrigerado e congelado já foi detectada por alguns autores, sendo notado um efeito benéfico na adição de plasma seminal de garanhões com alta motilidade ao ejaculado de garanhões com baixa motilidade (MATTOS et al., 2003).

A sensibilidade ao choque frio também varia consideravelmente entre garanhões e mesmo entre ejaculados. Em alguns animais a fertilidade do sêmen refrigerado por 24h pode reduzir a ponto de inviabilizar seu uso para

transporte, sendo então recomendada a inseminação logo após a colheita (AURICH, 2005).

De acordo com a susceptibilidade do sêmen à refrigeração, BRISNKO et al. (2000) classificaram o ejaculado de garanhões como de alta e baixa qualidade. Os de baixa qualidade apresentam redução superior a 40% da motilidade progressiva inicial após 24h de armazenamento.

2.5 Espécies reativas de oxigênio

Embora as células necessitem de oxigênio para exercer suas funções, o metabolismo oxidativo de moléculas biológicas pode ser potencialmente tóxico pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem modificar a função celular ou sua viabilidade (BAUMBER et al., 2000).

Grande parte do oxigênio consumido pela célula é utilizada na mitocôndria para a fosforilação oxidativa, onde é reduzido à água. Entretanto, uma pequena fração de oxigênio pode ser liberada da cadeia transportadora de elétrons e produzir EROS (URSO & CLARKSON, 2003). Os espermatozóides são capazes de produzir quantidades controladas de EROS de forma endógena, com o objetivo de induzir a capacitação espermática e a reação acrossomal, promovendo sua habilidade fertilizante. Todavia, quando a produção de EROS é excessiva torna-se prejudicial à fisiologia espermática, em virtude de reduzir a motilidade espermática, a capacidade de fusão dos gametas e a fertilidade, através da interação com lipídeos da membrana, proteínas e DNA mitocondrial e nuclear (BAUMBER et al., 2005).

As EROS cumprem importante função na fisiologia espermática normal, mas o desequilíbrio entre a sua produção e degradação causa efeitos adversos sobre o espermatozóide (BALL, 2008). O balanço entre a produção de EROS e a desintoxicação das mesmas pode ser fator importante de sobrevivência e funcionalidade dos espermatozóides antes, durante e após a criopreservação, influenciando diretamente a fertilidade. O estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio altera o funcionamento mitocondrial e conduz à morte celular programada (LIU et al., 2000). A interrupção da cadeia mitocondrial de

transporte de elétrons predispõe à formação de radicais livres (HICKS & MEDINA-NAVARRO, 1995).

Por estarem sujeitos a condições aeróbias, os espermatozóides também experimentam o efeito paradoxal do oxigênio, por este ser ao mesmo tempo necessário à vida, mas originar, durante o seu metabolismo oxidativo, a formação de espécies reativas de oxigênio, potencialmente tóxicas (BAUMBER et al., 2000). A produção de altos níveis de EROS nos espermatozóides causa perda da função e até morte celular, mas a produção de quantidades controladas é essencial para a aquisição da habilidade. Estas células são extremamente susceptíveis às EROS porque são deficientes em enzimas protetoras, pois perderam grande parte do citoplasma durante a espermiogênese (DeLAMIRANDE & LAMOTHE, 2009).

O estresse oxidativo é determinado pelo balanço entre a geração e degradação de EROS dentro de um tecido. Os espermatozóides e o plasma seminal possuem enzimas e antioxidantes de baixo peso molecular que eliminam as EROS, prevenindo possíveis danos celulares. Os sistemas protetores antioxidantes dos espermatozóides são primariamente de origem citoplasmática. Como o espermatozóide perde a maior parte do seu citoplasma durante o estágio final de diferenciação, eles apresentam uma defesa limitada contra o estresse oxidativo e são dependentes de antioxidantes presentes no plasma seminal. Três sistemas de enzimas participam desta proteção: superóxido desmutase, que tem a capacidade de remover o radical superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio; catalase, que destrói o peróxido de hidrogênio, produzindo água e oxigênio; e o sistema glutathione peroxidase/redutase, que é o mais importante na remoção de peróxidos nas células. Vários outros componentes do plasma seminal também são caracterizados como antioxidantes, incluindo ácido ascórbico, α -tocoferol, uratos, albumina, taurina e hipotaurina (BAUMBER et al., 2005).

As EROS são reconhecidas pelos efeitos deletérios sobre quase todos os tecidos e células, tendo sido associadas com câncer, problemas vasculares, diabetes, neuropatias, etc. São produzidas por uma variedade de sistemas e reações, tais como sistemas de transporte de elétrons, xantina oxidase e peroxidase (DeLAMIRANDE & LAMOTHE, 2009).

O radical livre é conceituado como qualquer espécie química, átomo, íon ou molécula que contém um número de elétrons não pareados na camada de valência, apresentando alta reatividade e instabilidade. Para BROUWERS et al. (2005) existem compostos igualmente tão reativos quanto os radicais livres, mas que não possuem elétron não pareado na última camada e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres. Estas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio ou espécies de nitrogênio reativas (ENR) e incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), principal espécie reativa no sêmen de equinos (BAUMBER et al., 2000); o cátion nitrosonium (NO^+); o ânion nitroxila (NO^-) e o peroxinitro ($ONOO^-$). Estima-se que entre 2 e 5% do oxigênio utilizado pela mitocôndria seja convertido em EROS (URSO & CLARKSON, 2003).

Os radicais livres podem reagir com diversas biomoléculas, subtraindo elétrons para se estabilizarem. Os substratos moleculares mais frequentes incluem os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, nucleotídeos no DNA, proteínas e carboidratos (BECKMAN & AMES, 1998). A reação inicial de oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados denomina-se lipoperoxidação e é gerada pelas EROS, que induzem uma reação em cadeia (MEDINA-NAVARRO et al., 1997).

Vários mecanismos são propostos para explicar o declínio da motilidade espermática em consequência do estresse oxidativo. Um dos mais citados se refere ao fato dos espermatozóides serem susceptíveis à peroxidação lipídica, em razão da alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana plasmática. Essa alta quantidade é que dá fluidez à membrana, que, por sua vez, é importante para a motilidade e participação nos eventos de fusão de membranas durante a fertilização, bem como para a manutenção da integridade estrutural. A perda da integridade pode levar ao aumento na permeabilidade da membrana, acarretando perda na capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle da motilidade espermática. A peroxidação excessiva lesará a membrana plasmática, diminuindo a motilidade e a capacidade fertilizante (AITKEN & BAKER, 2004).

A geração controlada de EROS exerce função fisiológica na sinalização de eventos relacionados com a capacitação espermática no homem (DeLAMIRANDE & GAGNON, 1993), e segundo BAUMBER et al. (2000),

também nos equinos; além de sinalizar eventos que controlam a reação acrossômica e a fusão do espermatozóide no oócito. Entretanto, a geração excessiva de EROS por espermatozoides que apresentam defeitos ou contaminação com leucócitos pode levar a estresse oxidativo. BAUMBER et al. (2002) revelaram que o estresse oxidativo em espermatozoides de equinos está associado com diminuição na motilidade e aumento na fragmentação do DNA espermático.

Desta maneira, os ácidos graxos insaturados podem ser atacados quimicamente pelo radical livre, fazendo com que ocorra reação propagadora de auto-oxidação, na formação de novos radicais livres. Como a membrana espermática é rica em ácidos graxos poliinsaturados, torna-se altamente sensível às EROS (BAUMBER et al., 2000).

As EROS possuem vida média muito curta devido à maior possibilidade de extrair elétrons de outras moléculas e formar outras substâncias reativas (PEREIRA, 1996), que são altamente lesivas e promovem trocas e modificações na sequência de bases de DNA, causando apoptose celular; alterações de cadeias protéicas e peroxidação lipídica, com consequente prejuízo do transporte intracelular; além de inativação dos canais de íons membranares, causando elevação de cálcio e ferro ionizados, o que pode culminar com o efeito citotóxico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Embora o sêmen equino seja rico em enzimas eliminadoras de EROS, os procedimentos que requerem diluição ou remoção do plasma seminal podem reduzir o efeito das mesmas (BALL et al., 2001).

O plasma seminal de equinos apresenta uma grande atividade de catalase e superóxido desmutase, existindo, porém, variações significativas entre garanhões na atividade destas enzimas (BALL, 2008). Entretanto, a remoção do plasma seminal que é feita durante a preparação dos espermatozoides para a criopreservação acarreta em remoção da fonte predominante de antioxidantes (BAUMBER et al., 2005), podendo aumentar a susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo, em consequência da remoção destas enzimas.

O volume do citoplasma espermático é pequeno e contém pequenas quantidades de substâncias “limpadoras” de EROS, o que proporciona aos espermatozoides grande sensibilidade ao estresse oxidativo (AITKEN, 1994).

AITKEN & CLARKSON (1988) mostraram que a adição de enzimas e antioxidantes às preparações espermáticas *in vitro* neutraliza os efeitos do estresse oxidativo sobre a motilidade e viabilidade espermática, a peroxidação lipídica, e a fragmentação do DNA.

Para BAUMBER et al. (2000) o estresse oxidativo durante a estocagem do sêmen é um fator associado com o declínio da fertilidade, especialmente pela geração de EROS, em consequência do metabolismo oxidativo. O peróxido de hidrogênio é a principal EROS relacionada com a perda de motilidade dos espermatozóides equinos, com modificações da membrana, em razão da peroxidação lipídica; bem como alterações na membrana acrossomal e função mitocondrial.

MORTE et al. (2008) realizaram estudo com o objetivo de correlacionar os efeitos do estresse oxidativo causado por EROS e lesões de DNA com os parâmetros clássicos de avaliação seminal em garanhões férteis e subférteis. Os resultados mostraram que durante a estação reprodutiva houve tendência de normalizar a oxidação lipídica nos espermatozóides e plasma seminal, bem como a oxidação protéica no plasma seminal de animais férteis e subférteis. Considerando que houve correlação positiva entre a oxidação protéica com a motilidade e viabilidade espermática, os resultados sugerem, segundo os autores, que a oxidação de proteínas do sêmen pode ser uma importante função espermática. Por outro lado, a oxidação lipídica parece ser um indicador de lesões dos espermatozóides. Acrescentaram, ainda, que altos níveis de EROS não causaram danos à integridade do DNA, sugerindo que as medidas se encontravam em níveis fisiológicos e/ou que houve uma eficiente atividade antioxidante das células espermáticas dos garanhões.

Na peroxidação lipídica, inicialmente, o radical hidroxila captura um átomo de hidrogênio de um carbono metileno da cadeia polialquil do ácido graxo poliinsaturado da membrana celular, formando o radical lipídico. O fato de o oxigênio ser sete a oito vezes mais solúvel em meio não polar do que em meio polar permite que as membranas biológicas apresentem elevada concentração de oxigênio na região hidrofóbica medial, resultando em maior dano aos ácidos graxos poliinsaturados, que irá determinar maior susceptibilidade à desestruturação provocada pela peroxidação lipídica (ALVAREZ et al., 1987). Assim, um ácido graxo com elétron desemparelhado

reage com o oxigênio gerando o radical peroxila, produto altamente reativo, que pode se combinar com outros radicais semelhantes, alterando as proteínas de membrana (BAUMBER et al., 2000).

2.6 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação através da inibição da produção ou dos efeitos deletérios dos radicais livres (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Em condições normais os mecanismos antioxidantes celulares, presentes em quase todos os tecidos e suas secreções, são responsáveis por inibir a elevada produção de EROS, protegendo as células de danos oxidativos (BALL et al., 2001). Todavia, o controle da concentração das EROS ocorre pela inclusão de antioxidantes ou pelo uso de condições que reduzam a oxidação durante o congelamento (AGARWAL et al., 2004). A eficácia do antioxidante depende do tipo e da concentração das EROS produzidas (PEÑA et al., 2003). Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas falhe na proteção ou mesmo aumente as lesões induzidas em outros sistemas (HALLIWELL, 1990).

Células somáticas contêm antioxidantes dentro de seu citoplasma, porém o espermatozóide perde a maioria de seu citoplasma durante a maturação, faltando, assim, mecanismos endógenos que regulem e realizem as defesas enzimáticas observadas em outros tipos celulares (BAUMBER et al., 2005). Por conseguinte, com o objetivo de reduzir os danos oxidativos causados pela elevada concentração de EROS exógenas, pesquisadores têm adicionado substâncias antioxidantes aos diluentes de sêmen de equinos (AURICH et al., 1997; BALL et al., 2001; BAUMBER et al., 2005), suínos (GADEA et al., 2004; GADEA et al., 2005), bovinos (BILODEAU et al., 2001), ovinos (UPRETI et al., 1997), aves (BRÉQUE et al., 2003) e homens (AGARWAL & SALEH, 2002).

Segundo AITKEN (1999), o espermatozóide apresenta um sistema intracelular de defesa antioxidante contra EROS, desempenhado pelos antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutational

peroxidase e redutase) e não enzimáticos (ácido ascórbico e α -tocoferol). Entretanto, enzimas antioxidantes intracelulares não conferem proteção total à membrana plasmática que envolve o acrossomo e a cauda, forçando os espermatozóides a suplementarem essa limitada defesa intrínseca com a proteção conferida pelo plasma seminal, que contém antioxidantes enzimáticos (ALVAREZ & STOREY, 1989) responsáveis por neutralizar a ação do O_2^- e H_2O_2 ; além de uma variedade de antioxidantes não enzimáticos, como ácido ascórbico, urato, α -tocoferol piruvato, taurina e hipotaurina (AGARWAL & SALEH, 2002).

A criopreservação dos espermatozóides está associada com estresse oxidativo promovido por EROS, as quais exercem mudanças físicas e químicas na membrana espermática, pois há perda da dinâmica existente entre as substâncias pró e antioxidativas, prejudicando o sistema de defesa antioxidante e favorecendo a formação das EROS e o estresse oxidativo (BAUMBER et al., 2000).

Ocorre redução na motilidade, viabilidade, integridade acrossomal (BALL, 2008) e no potencial de fertilização (ROCA et al., 2004) em função da peroxidação lipídica desencadeada pelas EROS durante o processo de criopreservação do sêmen, tendo em vista que os espermatozóides de mamíferos apresentam altos níveis de fosfolípidos e ácidos graxos saturados e poliinsaturados.

Dentro de um sistema anaeróbico, ou mesmo parcialmente aeróbico, a produção de EROS é inevitável. Os radicais mais lesivos são superóxido, peróxido e hidroxila. Os peróxidos são os oxidantes mais agressivos dentre todos os pró-oxidantes formados (BILODEAU et al., 2001).

As lesões oxidativas ao DNA mitocondrial e à estrutura da membrana representam fatores da maior importância para explicar a redução da fertilidade e motilidade do sêmen criopreservado (CUMMINS et al., 1994). Considerando que as mitocôndrias são as responsáveis pela produção de energia necessária para a motilidade espermática, mudanças no potencial mitocondrial podem representar um bom indicador para a diminuição da capacidade funcional.

BAUMBER et al. (2000) mostraram que o aumento de EROS resultou em declínio acentuado da motilidade, embora não tenha sido detectada diminuição na viabilidade espermática ou na integridade acrossomal; e que a

motilidade pode ser um indicador mais sensível do estresse oxidativo, sendo inibida antes de algum aumento mensurável na peroxidação lipídica, o que indica que ela pode ser afetada pelas EROS através de um mecanismo de ação que não envolva a peroxidação lipídica. Talvez este efeito adverso na motilidade possa ser devido a alterações na função mitocondrial.

A criopreservação do sêmen equino pode promover lesões nas mitocôndrias espermáticas. Segundo BALL (2008), a avaliação morfológica dos espermatozóides após o processo de congelamento/descongelamento demonstra edema da peça intermediária de intensidade moderada a forte, o que caracteriza distensão das mitocôndrias, sugerindo que estas organelas representam um local significativo de lesões pela criopreservação, gerando EROS e induzindo mudanças apoptóticas.

Os radicais livres são bloqueados pelos sistemas antioxidantes. As substâncias antioxidantes apresentam a importante função de recolher os radicais livres responsáveis por causar a peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozóides (BAUMBER et al., 2000).

Em equinos, a adição de antioxidantes, como ácido ascórbico ou piruvato, manteve a integridade da membrana em melhores condições, bem como a motilidade espermática (AURICH et al., 1997).

BALL (2008) analisou vários experimentos com a adição de antioxidantes ao sêmen equino criopreservado, concluindo que essas substâncias não mostraram efeito positivo sobre os parâmetros de motilidade pós-descongelamento, bem como não diminuíram a fragmentação de DNA ou aumentaram o potencial de membrana mitocondrial. Já, AGUERO et al. (1995) relataram efeito positivo da adição de α -tocoferol ao sêmen equino criopreservado. FOOTE et al. (2002), avaliando vários antioxidantes, ao sêmen bovino fresco ou congelado, não observaram resultado benéfico.

BALL et al. (2001) realizaram estudo para avaliar o efeito de antioxidantes na manutenção da motilidade do sêmen equino refrigerado a 5°C, por um período de 72 a 96 horas, mostraram que em alguns casos houve efeito na manutenção de parâmetros da cinética espermática, porém em nenhum caso ficou claramente evidenciado o efeito positivo dos antioxidantes aos espermatozóides refrigerados. Os autores afirmaram, ainda, que existiu uma grande variação na atividade da catalase entre os ganhos.

2.6.1 Glutathione

A glutathione está presente em todo organismo animal, não apenas em células somáticas, mas também em gametas. Ela é um tiol tri-peptídeo (γ -glutamina-cisteína-glicina) não protéico, sendo o maior composto sulfidril não protéico que desempenha diversas funções biológicas, dentre elas a reação de redução que se contrapõe aos processos oxidativos. É sintetizada a partir dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina. Estes aminoácidos não essenciais podem ser sintetizados no organismo e também obtidos a partir da dieta (KIM et al., 1999).

Seu poder redutor é utilizado para manter os grupos tiol nas proteínas intracelulares e em outras moléculas. Atua como reservatório fisiológico da cisteína e está envolvida na regulação da síntese protéica, detoxificação celular e síntese de leucotrienos. A evolução biológica da glutathione indica que existe uma estreita correlação entre ela e o metabolismo eucariótico aeróbico, mostrando que esta molécula evoluiu para proteger as células contra a toxicidade causada pelo oxigênio (LUBERDA, 2005).

Esta molécula pode ser rapidamente utilizada como uma defesa contra as EROS. A proteção contra o dano oxidativo conferida pela glutathione se deve ao seu grupamento sulfidril (SH), que pode estar em duas formas: a reduzida (GSH) e a oxidada (GSSG). O ataque da GSH às EROS é facilitado pelas interações com enzimas associadas, tais como a glutathione redutase e glutathione peroxidase (GPx) (LUBERDA, 2005).

A glutathione peroxidase é uma enzima antioxidante selênio-dependente, que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (e também produtos da peroxidação lipídica) na presença da GSH, a qual é convertida em GSSG. Em seguida, sofre reação de redução pela glutathione redutase na presença de fosfato dinucleotídico de nicotinamida e adenosina (NADPH), havendo redução de NADPH⁺ que é convertido a NADP (ARUOMA et al., 1989).

O Sistema tiol antioxidante, representado principalmente pela glutathione, dominante no sêmen do garanhão, ocorre largamente no plasma seminal. A

quantidade de GSH no plasma seminal é dez vezes maior que no sêmen de suínos (LUBERDA, 2005).

Sobre as demais funções da GSH podemos citar sua participação no estoque e transporte da cisteína, regulação do balanço “redox”, metabolismo de prostaglandinas e leucotrienos, síntese de desoxirribonucleotídeos, função imune e proliferação celular. No entanto, a calatase e a GPx são os principais varredores enzimáticos de EROS, estando presentes em teores elevados nos eritrócitos e hepatócitos (LUBERDA, 2005).

2.6.2 Cisteína

A cisteína é um aminoácido de baixo peso molecular contendo um grupamento tiol. É um antioxidante não enzimático que previne a peroxidação lipídica (BILODEAU et al., 2001). Tanto a cisteína quanto a N-acetil-L-cisteína, são precursoras da biossíntese da glutathione e aumentam os níveis de glutathione reduzida (GSH) (BILODEAU et al., 2001). A glutathione reduzida é capaz de agir diretamente em muitas EROS (LUBERDA, 2005), além de ser um co-fator para a glutathione peroxidase, que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos, protegendo a célula contra o estresse oxidativo.

Nos últimos anos a cisteína tem sido usada como antioxidante na criopreservação do sêmen de cães (MICHAEL, et al., 2008).

3 REFERÊNCIAS

1. AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinics of North America**, v.29, p.817-827, 2002.
2. AGARWAL, A.; NALLELLA, K.P.; ALLAMANENI, S.S.; SAID, T.M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reproductive Biomedicine online**, v.8, p.616-627, 2004.
3. AGUERO, A.; MIRAGAYA, M.H.; MORA, N.G.; CHAVES, M.G.; NEILD, D.M.; BECONI, M.T. Effect of vitamin E addition on equine sperm preservation. **Comptes Rendus Biologies**, v.13, p.343-356, 1995.
4. AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of Andrology**, v.9, p.367-376, 1988.
5. AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. **Reproduction Fertility Development**, v.6, p. 9-24, 1994.
6. AITKEN, R.J. The amoroso lecture. The human spermatozoa – a cell in crisis. **Journal o Reproduction and Fertility**, v.115, p.1-7, 1999.
7. AITKEN, R.J., BAKER, M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction, fertility and development**, v.16, p.581-588, 2004.
8. ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; KUSTER, C.; PARSLEY M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. **Theriogenology**, v.50, p.535-546, 1998.
9. 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.
10. ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Research**, v.23, p.77-90, 1989.
11. AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.
12. AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKinnon, A.O.; Voss, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745, 1992.

13. ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide and hypochlorous acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.6, p.593-597, 1989.
14. AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.185-192, 1997.
15. AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.
16. AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.268-275, 2008.
17. AVANZI, B.R.; FARRÁS, M.C.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA, J.A.; MEDEIROS, A.S.L.; ARAÚJO, G.H.M.; PAPA, F.O. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.152-154, 2006.
18. BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.56, p.577-589, 2001.
29. BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.257-267, 2008.
20. BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.181-190, 2001.
21. BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, p.895-902, 2000.
22. BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1025-1033, 2002.
23. BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers

and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, p.772-779, 2005.

24. BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v.78, p.547-581, 1998.

25. BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v.56, p.275-286, 2001.

26. BRÉQUE, C.; SURAI, P.; BRILLARD, J.P. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa *in vivo* and *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.66, p.314-323, 2003.

27. BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination and preservation of semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.8, p.205-218, 1992.

28. BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v.54, p.129-136, 2000.

29. BROUWERS, J.F.; SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. **Theriogenology**, v.63, p.468-469, 2005.

30. CUMMINS, J.M.; JEQUIER, A.M.; KAN, R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.345-362, 1994.

31. DeLAMIRANDE, E.; GAGNON, C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.16, p.21-25, 1993.

32. DeLAMIRANDE, E.; LAMOTHE, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.46, p.502-510, 2009.

33. DOBRINSKI, I.; SMITH, T.T.; SUAREZ, S.S.; BALL, B.A. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.56, p.861-869, 1997.

34. DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, n.3, p.291-304, 1984.

35. DUARTE- ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema -caroteno/ácido

linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.446-452, 2006.

36. FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C. KAPROTH, MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.13-23, 2002.

37. GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A.; COY, P.; MATÁS, C.; ROMAR, R.; RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm alter cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, v.62, p.690-701, 2004.

38. GADEA, J.; GARCÍA-VAZQUEZ, F.; MATÁS, C.; GARDÓN, J.C.; CÁNOVAS, S.; GUMBAO, D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. **Journal of Andrology**, v.26, p.396-404, 2005.

39. GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóide e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6.ed. São Paulo: Editora Manole, 1995. cap.7, p.167-190.

40. HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radicals Research Communications**, v.9, p.1-32, 1990.

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

42. HICKS, J.J.; MEDINA-NAVARRO, R. Inhibitory capacity of human serum on induced microsomal lipoperoxidation. **Archives of Medicine and Research**, v.26, p.169-172, 1995.

43. LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do complexo do agronegócio do cavalo: Relatório final**. CEPEA/ESALQ/USP. 2006, 251p.

44. LIU, L.; TRIMARCHI, J.R.; KEEFE, D.L. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1745-1753, 2000.

45. LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v.64, p.480-491, 2005.

46. LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v.5, p.5-17, 2005.

47. KARESKOSKI, A.M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.33-38, 2006.

48. KIM, I.H.; VAN LANGENDONCKTT, A.; VAN SOOM, A.; VANROOSE, G.; CASI, A.L.; HENDRIKSEN, P.J.M.; BEVERS, M.M. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.52, p.537-547, 1999.
49. MACHADO, M.S.; LEÃO, K.M.; GOMES, G.M.; MACEDO, L.P.; ALVARENGA, M.A. Efeitos de diferentes sistemas de transporte sobre a qualidade do sêmen refrigerado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.194-196, 2002.
50. MATTOS, R.C.; SCHMITT, F.L.; OBERST, E.R.; JOBIM, M.I.M. Influência do plasma seminal de garanhões de baixa e alta qualidade espermática na motilidade, integridade e funcionalidade de membrana plasmática de espermatozoides resfriados a +4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.336-338, 2003.
51. MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American Journal of Physiology**, v.247, p.125-142, 1984.
52. MEDINA-NAVARRO, R.; LIFSHITZ, A.; WACHER, N.; HICKS, J.J. Changes in human serum antioxidant capacity and peroxidation after four months of exposure to air pollutants. **Archives of Medical Research**, v.28, p.205-208, 1997.
53. MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCO, C.M. Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.201-207, 2008.
54. MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. **Theriogenology**, v.70, p.463-468, 2008.
55. MORTE, M.I.; RODRIGUES, A.M.; SOARES, D.; RODRIGUES, A.S.; GAMBOA, S.; RAMALHO-SANTOS, J. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: Seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. **Animal Reproduction Science**, v.6, p.36-47, 2008.
56. PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.
57. PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTINEZ, H. R. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.85-98, 2003.

58. PEREIRA, B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para funcionalidade imunológica. **Motriz**, v.2, p.71-79, 1996.
59. PICKETT, B.W. The stallion: Retrospective analysis and opinions. **Biology Reproduction (Mono 1)**, p.547-564, 1995.
60. POMMER, A.C.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. **Theriogenology**, v.57, p.1493-1501, 2002.
61. PROVINCE, C.A.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.23, p.925-934, 1985.
62. ROCA, J.; GIL, M.A.; HERNANDEZ, M. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Journal of Andrology**, v.25, p.397-405, 2004.
63. SAMPER, J.C. Artificial insemination. In: SAMPER, J.C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: WB Saunders Company; 2000, p.109–131.
64. SIEME, H.; HARRISON, R.A.P.; PETRUNKINA, A.M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.276-292, 2008.
65. SILVA FILHO, J.M., PALHARES, M.S., FONSECA, F.A. Transporte e inseminação artificial com sêmen de equino. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG**, n.11, p.3-112, 1994.
66. SQUIRES, E.L., BRUBAKER, J.K., McCUE, P.M., PICKETT, B.W. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. **Theriogenology**, v.28, p.709-718, 1998.
67. UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, R.; MUNDAY, R.; SMITH, J.F. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.269-278, 1997.
68. URSO, M.L.; CLARKON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v.189, p.41-54, 2003.
69. VALLE, G.R., SILVA FILHO, J.M., PALHARES, M.S., MELO, M.A., MAGNAGO, L.G.P. Utilização de um container modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.505-514, 1999.

70. VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v.48, p.907-917, 1997.
71. VIDAMENT, M.P.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C. ; MAGISTRINI, M. ; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improves post thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.907-919, 2000.
72. VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.115-136, 2005.
73. WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

CAPÍTULO 2 - ADIÇÃO DE GLUTATIONA AO DILUENTE, PARA CONGELAMENTO DE SÊMEN EQUINO FRESCO E REFRIGERADO, UTILIZANDO DIFERENTES PROTOCOLOS DE CONGELAMENTO

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito *in vitro* da adição de glutathione em cinco concentrações (controle; 2,5; 5,0; 7,5 e 10mM), tratamento 1 a 5, respectivamente, sobre espermatozoides de 12 garanhões em diferentes protocolos de congelamento, sendo Experimento I (EI): congelamento automatizado imediatamente pós-colheita e Experimento II (EII): congelamento automatizado (RM) e manual (RG) após refrigeração passiva por 24h a 16°C. As variáveis avaliadas foram motilidade total e progressiva, vigor, integridade das membranas plasmática e acrossomal. Para EI utilizou-se, após descongelamento, a análise computadorizada da cinética espermática. No EI a motilidade total foi superior nos tratamentos 1 e 2 ($p<0,05$); a motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática foram superiores no tratamento 2 ($p<0,001$). Para integridade de membrana acrossomal o tratamento 3 apresentou os melhores resultados ($p<0,05$). No EII a motilidade progressiva do tratamento 1 (RM) foi superior ($p<0,05$). Considerando-se as diferentes concentrações de glutathione, verificou-se que o tratamento 2 mostrou maior percentual de motilidade progressiva, nos dois métodos ($p<0,05$) e que em RM os resultados de integridade de membrana foram superiores no tratamento 1 ($p<0,05$), mas em RG os melhores resultados para integridade de membrana plasmática foram verificados no tratamento 2. Para integridade acrossomal os percentuais foram ligeiramente maiores no tratamento 3. A adição de glutathione na concentração de 2,5mM ao meio de congelamento preserva a motilidade total, incrementa significativamente a motilidade progressiva e a integridade de membrana plasmática, tanto para sêmen congelado imediatamente pós-colheita quanto para o refrigerado e congelado de forma manual. Concentrações superiores a 2,5mM foram deletérias aos espermatozoides nos diferentes protocolos de congelamento, com ou sem refrigeração passiva.

Palavras-chave: Antioxidante, espermatozoide, garanhão, recursos genéticos, sêmen congelado

CHAPTER 2 – ADITION OF GLUTATHIONE TO THE DILUENT FOR FROZEN FRESH AND COOLED STALLION SEMEN IN DIFFERENT PROTOCOLS

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of *in vitro* addition of glutathione at five concentrations (control, 2.5, 5.0, 7.5 and 10mM), treatment 1 to 5, respectively, on spermatozoa from 12 stallions in different frozen protocols. In Experiment I (EI) spermatozoa were cryopreserved using an automated system immediately after collection. For Experiment II (EII) the automated or manual system (RM, RG) were used after cooling the seminal samples during 24 hours at 15°C. Analyzed variables were motility (total and progressive), vigor, integrity of plasmatic and acrosome membranes. For EI the computerized analysis of sperm kinetics were used. In EI total motility was higher in treatment 1 and 2 ($p<0.05$). Progressive motility and integrity of plasmatic membrane were higher in treatment 2 ($p<0.001$). For acrosome's integrity, treatment 3 showed the best results ($p<0.05$). In EII, motility in treatment 1 (RM) was higher ($p<0.05$). Considering the different concentrations of glutathione, it was found that treatment 2 showed a higher percentage of progressive motility in both methods ($p<0.05$); for RM results of membrane integrity were higher in treatment 1 ($p<0.05$), but in RG the best results for plasma membrane integrity were observed in treatment 2; acrosomal integrity percentages were slightly higher in treatment 3. The addition of 2.5 mM glutathione to the freezing diluent preserves the total motility and increases significantly progressive motility and plasmatic membrane integrity, both for semen frozen immediately after collection and for the cooled and frozen manually. Concentrations above 2.5 mM were deleterious to sperm in all protocols of freezing, with or without cooling.

Keywords: Antioxidant, frozen semen, genetic resource, spermatozoa, stallion

1 INTRODUÇÃO

Cinquenta e quatro anos se passaram desde o nascimento do primeiro potro com a utilização do sêmen congelado (BARKER & GANDIER, 1957). Desde então avanços significativos foram observados com a utilização dessa biotécnica, entretanto os índices de prenhez continuam baixos e sujeitos a inúmeras variáveis.

A utilização do sêmen congelado criou uma nova dimensão para a criação de equinos por possibilitar a preservação por tempo indeterminado desse material e permitir a distribuição mundial, o que maximiza a utilização de garanhões com mérito genético superior e reduz custos com transporte e doenças. Barreiras geográficas são abolidas, além disso, pode-se utilizar sêmen congelado de garanhões que estão em competição ou se recuperam de patologias que os impedem de cobrir, ou até mesmo de garanhões mortos (MILLER, 2008).

O uso do sêmen refrigerado e congelado cada vez mais ganha adeptos na “indústria” equina. O procedimento utilizado para refrigerar sêmen é relativamente simples e pode ser realizado em todas as propriedades. Entretanto a criopreservação requer equipamentos caros e sofisticados, indisponíveis na maioria dos criatórios. Várias metodologias têm sido desenvolvidas com sucesso para congelamento de sêmen fresco, imediatamente após a colheita, o que requer que o garanhão esteja localizado no mesmo local dos equipamentos. A colheita e envio do sêmen refrigerado para um local especializado facilita o processo de congelamento, sem a necessidade de deslocamento do garanhão até as universidades ou centrais de reprodução, nem transporte de equipamentos caros e pesados até as propriedades (CROCKETT et al., 2001).

A tecnologia de refrigeração do sêmen equino tem sido estudada pelo interesse na manutenção do potencial fertilizante durante um período prolongado, dando maior flexibilidade ao proprietário do garanhão para colher e enviar o sêmen no momento oportuno (HECKENBICHLER et al., 2011). A utilização do sêmen refrigerado apresenta vantagens, como a redução com os gastos inerentes ao transporte e hospedagem de animais, a diminuição do estresse pelo transporte destes, bem como riscos de acidentes e doenças

resultantes da exposição à patógenos de um novo ambiente (BRINSKO & VARNER, 1992).

A manipulação do sêmen equino durante esses processos reduz a viabilidade e fertilidade espermática em consequência, entre outros problemas, da peroxidação de lipídios da membrana, devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados que tornam as células altamente susceptíveis à ação dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROS) (COCCHIA et al., 2011).

O efeito oxidativo causado pela geração das EROS pode ser diminuído pela adição de antioxidantes ao plasma seminal ou aos diluentes utilizados no congelamento. Os resultados são contraditórios quanto à preservação da viabilidade do espermatozóide no sêmen fresco e congelado em virtude do tipo e da concentração do antioxidante utilizado, assim como seu mecanismo de ação específico referente à proteção espermática (BAUMBER et al., 2005).

Um dos antioxidantes incorporados ao sêmen de algumas espécies é a glutathione, um tiol tripeptídico (γ -glutamilcisteinilglicina) com inúmeras funções biológicas e encontrado amplamente no organismo animal, não só nas células somáticas como nos gametas. Esse tiol tem um papel importante na antioxição de compostos endógenos e exógenos, assim como na manutenção da condição redox intracelular. A glutathione é um reservatório natural de força redutora, que pode ser usada de forma rápida pelas células como defesa contra o estresse oxidativo (LUBERDA, 2005).

O grupo sulfídrico (SH) confere à glutathione proteção contra danos oxidativos. A glutathione existe em duas formas: reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A ação protetora da glutathione contra as EROS é facilitada pela interação das enzimas, tanto peroxidase como redutase (LUBERDA, 2005).

O sistema de defesa antioxidante presente no sêmen de mamíferos consiste principalmente em sistemas enzimáticos e não enzimáticos, sendo que o último é representado principalmente pela glutathione. A função básica da GSH no sêmen é a interação com outros sistemas para prevenir ação das EROS. Essa função “escaneadora” da GSH ajuda a contrapor o efeito do estresse oxidativo nas células espermáticas, que pode resultar em peroxidação lipídica do plasmalema, perda irreversível da motilidade, extravasamento das enzimas intracelulares e danos na cromatina (AITKEN, 1999).

A escassez de informações quanto às variáveis de fertilidade, e a disparidade de dados sobre o efeito de antioxidantes adicionados ao sêmen criopreservado de equinos, indicam a necessidade de mais estudos. Assim, objetivou-se avaliar o efeito *in vitro* da adição do antioxidante glutathione, em cinco concentrações, sobre espermatozoides equinos submetidos à criopreservação em diferentes protocolos de congelamento, com ou sem refrigeração prévia, avaliando motilidade, vigor, integridade funcional e estrutural das membranas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e período experimental

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Reprodução Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Foram utilizados doze garanhões das raças Quarto de milha, Árabe e Cruza-árabe com idade entre 4 e 15 anos, mantidos sob o mesmo manejo alimentar, alojados na região metropolitana de Goiânia, entre os meses de abril e maio/2009.

2.2 Colheita e processamento de material

Após o esgotamento das reservas extra-gonadais, os garanhões foram submetidos a três colheitas de sêmen em dias alternados, obtendo-se 36 ejaculados por meio de vagina artificial modelo “Botucatu”, composta por um tubo rígido de PVC, tubo flexível de látex, camisa sanitária descartável e copo coletor com filtro de náilon acoplado para obtenção da fração livre de gel. A metodologia empregada foi a colheita fechada e a temperatura da vagina artificial em torno de 42-44°C. Para realização das colheitas, utilizou-se uma égua em cio devidamente contida. No momento da monta, o pênis ereto foi desviado em direção da vagina artificial. A ejaculação foi detectada pelos jatos ejaculatórios, verificados com a palma da mão na porção ventral do pênis ou observação dos movimentos da cauda.

Imediatamente após a colheita avaliou-se a motilidade total e progressiva, vigor, concentração, pH, osmolaridade, morfologia espermática e integridade das membranas plasmática e acrossomal.

O percentual de espermatozóides móveis e o vigor foram avaliados com 20µL de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C, em aumento de 200x, em microscópio óptico de contraste de fase (BX41TF, Olympus, Japão), classificando a motilidade progressiva de 0 a 100% e o vigor de 0 a 5 (CBRA, 1998).

A concentração espermática foi avaliada com a contagem em câmara hematómetrica (Neubauer) após diluição 1:20 (sêmen/formol citrato tamponado, Anexo I). As duas áreas da câmara (superior e inferior) foram preenchidas com sêmen diluído e após cinco minutos, tempo necessário para sedimentação dos espermatozóides, cinco quadrados de cada uma das duas áreas foram avaliados. Essa avaliação foi realizada em microscópio óptico, em aumento de 400x (CBRA, 1998).

O pH foi aferido com pHmetro (Q400BC, Quimis, Diadema, SP) imergindo o eletrodo na amostra seminal e a leitura do valor verificada no visor após estabilização. A osmolaridade foi avaliada com osmômetro de pressão de vapor (VAPRO®, Wescor Inc, Logan, Utah, EUA).

Para avaliação da morfologia espermática foi utilizada a técnica de câmara úmida, na qual uma amostra de 20µL, daquela reservada para concentração espermática, foi colocada entre lâmina e lamínula e contados 200 espermatozóides, em aumento de 1000x no contraste de interferência diferencial (DIC) do microscópio óptico. As porcentagens das diversas anormalidades morfológicas foram agrupadas e classificadas em defeitos maiores, menores e espermatozóides normais (CBRA, 1998).

Para avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática foi utilizada a coloração supravital com o corante eosina-nigrosina, em que volumes iguais (20µL) de sêmen e corante foram colocados sobre lâmina de vidro identificada e aquecida a 37°C, homogeneizados, realizando-se o esfregaço, os quais foram secos ao ar. A leitura foi realizada em aumento de 1000x, contando-se 500 espermatozóides, imediatamente após secagem da lâmina e classificando-se os não corados como aqueles de membrana íntegra (DOTT & FOSTER, 1972).

Para integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide foi realizado o teste hiposmótico em câmara úmida, por meio da incubação de 100µL de sêmen em 1,0mL de solução de sacarose a 100mOsm/L em banho maria a 37°C por 30 minutos. Após esse período, 20µL dessa solução foi avaliada em câmara úmida em microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x. Foram contados 200 espermatozóides, considerando-se a apresentação da cauda enrolada indicativo de membrana íntegra, após

descontar o percentual de alterações de cauda obtido na avaliação morfológica (MELO & HENRY, 1999).

Para avaliação da integridade de membrana acrossomal utilizou-se a coloração *Trypan Blue/Giemsa*. Volumes iguais de sêmen e corante *Trypan Blue* 0,2% (20µL) foram colocados sobre lâmina identificada e aquecida a 37°C e homogeneizados, realizando-se o esfregaço, o qual foi seco ao ar. Os esfregaços secos foram fixados em solução de vermelho neutro (ANEXO II) por cinco minutos, lavados em água corrente, novamente secos ao ar e então submersos em solução de corante *Giemsa* 7,5% por 4h (KÚTVÖLGYI et al., 2006)

A leitura foi realizada em aumento de 1000x, contando-se 200 espermatozóides, classificando-os nas seguintes categorias: vivos – acrossomo corado em rosa ou roxo e região pós acrossomal não corada; mortos – corados em azul na região pós acrossomal e acrossomo corado em roxo ou rosa; reação acrossomal verdadeira – acrossomo e região pós acrossomal não coradas e reação acrossomal falsa – acrossomo não corado e região pós acrossomal corada em azul (DIDION et al., 1989)

Imediatamente após a colheita, o ejaculado foi diluído para obter a concentração de 50×10^6 espermatozóides/mL com meio à base de leite em pó desnatado, glicose, bicarbonato de sódio e amicacina (Botu-sêmen® – Biotech Botucatu – Botucatu/SP). Após a homogeneização com o meio, o conteúdo foi dividido em 2 alíquotas de igual volume, sendo uma delas processada para congelamento imediato (Experimento I), e a outra acondicionada em embalagem plástica atóxica e estéril, retirando-se todo o ar e fechando-se hermeticamente (Experimento II). Essa segunda alíquota foi utilizada para o processamento de refrigeração, em um sistema comercial constituído por duas caixas de isopor com fonte de gelo reciclável, mantendo a temperatura de 16°C por 24 horas (Max-Sêmen®, Campinas, SP).

2.3 Adição de antioxidante e congelamento das amostras

Para o Experimento I, a alíquota foi centrifugada a 600g por 10 minutos e os sedimentos de espermatozóides (*pellets*) ressuspensos com meio de

congelamento (Botucurio[®], Biotech Botucatu, Botucatu, SP), ajustando uma concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL, sendo a solução resultante fracionada em cinco tubos de centrifuga de 15mL. Essas alíquotas resultantes foram designadas para os grupos de tratamento pela adição de glutathione (G6013 - Sigma Chemical CO, EUA) nas diferentes concentrações: controle (tratamento 1); 2,5 (tratamento 2); 5 (tratamento 3); 7,5 (tratamento 4) e 10mM (tratamento 5).

Após a homogeneização o conteúdo foi utilizado para o preenchimento das palhetas de 0,5mL, as quais foram acondicionadas na máquina de congelamento (TK 3000[®] SE modular e compacta, TK, Uberaba, MG) para curva de refrigeração (estabilização) e congelamento.

Para estabilização, as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, que foi acondicionado ao tubo de resfriamento até a temperatura de estabilização (5°C), obedecendo uma curva de resfriamento de -0,25°C/minuto (rampa positiva), aguardando 20 minutos nesta temperatura. Após esse intervalo, o porta-palhetas foi removido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido, com uma curva de congelação 15°C/minuto de 5°C até -80°C e de 10°C até -120°C (rampa negativa). As palhetas foram removidas do recipiente e imersas no nitrogênio líquido para serem acondicionadas em raques previamente identificadas e acondicionadas em canecos no botijão criogênico.

Para o Experimento II, a alíquota mantida por 24 horas em sistema de refrigeração passiva foi processada da mesma forma descrita para o Experimento I, ou seja, centrifugação, ressuspensão dos *pellets* com meio de congelamento Botucurio, divisão em cinco tubos contendo as diferentes concentrações de glutathione (tratamento 1 a 5) e preenchimento das palhetas. A partir desse momento as palhetas foram distribuídas para dois sistemas de estabilização e congelamento: automático (RM) e manual (RG).

Para RM o procedimento foi semelhante ao Experimento I. Para RG as palhetas foram colocadas em posição horizontal sobre uma estante de metal e mantidas em refrigerador comercial (Eletrolux R130, Eletrolux Brasil, Curitiba, PR) a 5°C por 20 minutos (rampa positiva). Após esse tempo a estante foi mergulhada em recipiente isotérmico contendo nitrogênio líquido, ficando as palhetas a 6cm do vapor por mais 20 minutos (rampa negativa).

Após a curva nos dois sistemas, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido para serem acondicionadas em raques previamente identificadas e organizadas em canecas no botijão criogênico.

2.4 Análises pós-descongelamento

Duas palhetas, de um mesmo garanhão, de cada partida, foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, duas semanas após o congelamento, em tubo de microcentrífuga com capacidade de 1,5mL, pré-aquecido a 37°C.

As análises pós-descongelamento foram as mesmas descritas no item 2.2, além da avaliação computadorizada de características do movimento espermático - CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) no Experimento I.

2.4.1 Avaliação computadorizada de características do movimento espermático

Para avaliação da cinética espermática, 2µL de sêmen, descongelado conforme procedimento descrito no item 2.4, foram colocados na lâmina de leitura (Makler® counting chamber, Selfi-medical instruments, Califórnia, EUA), sendo a amostra avaliada no aparelho modelo Ivos-Ultimate 12 da *Hamilton Thorne Biosciences*, previamente ajustado (ANEXO III) para análise de sêmen equino (Anexo II). Três campos foram selecionados para leitura e análise. As variáveis mensuradas foram as seguintes: Motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade de trajeto (µm/s; VAP), velocidade retilínea (µm/s; VSL), velocidade curvilínea (µm/s; VCL), amplitude lateral de cabeça (µm; ALH), frequência de batimentos (Hz; BCF), linearidade (%; LIN) e retilinearidade (%; STR).

2.5 Análise estatística

No experimento I o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, e no experimento II um esquema fatorial 5x2 onde as parcelas

ANEXO I**FORMOL-CITRATO**

Citrato de sódio	2,9g
Formaldeído 35%	4,0mL
Água destilada	Completar até 100mL

ANEXO II**VERMELHO NEUTRO**

Solução ácido clorídrico 1 N	86mL
Formaldeído 37%	14mL
Vermelho neutro	0,2g

ANEXO III

SETUP – HAMILTON THORNE BIOSCIENCES (Ultimate – Sperm Analyzer)

CARACTERÍSTICA	AJUSTE
Número de imagens adquiridas	45
Taxa de aquisição das imagens	60Hz
Contraste mínimo de célula	70 pixels
Tamanho mínimo de célula	4 pixels
Contraste para células imóveis	30 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	60%
Referência de VAP para células lentas	20,0 $\mu\text{m/s}$
VAP mínimo para células progressivas	50,0 $\mu\text{m/s}$
Referência de VSL para células lentas	20,0 $\mu\text{m/s}$
Limite superior de tamanho da célula	1,51 pixels
Limite inferior de tamanho da célula	0,32 pixels
Limite superior de intensidade da célula	1,19
Limite inferior de intensidade da célula	0,24
Limite superior de alongamento da célula	98%
Limite inferior de alongamento da célula	0%
Tamanho da cabeça estática	0,32 a 1,51
Intensidade da cabeça estática	0,62 a 1,20
Aumento	1,89
Temperatura	37°C