

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

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NA QUALIDADE DO SÊMEN
CRIOPRESERVADO DE BOVINOS**

Cátia Oliveira Guimarães

Orientador: Dr. José Robson Bezerra Sereno

GOIÂNIA

2011

CÁTIA OLIVEIRA GUIMARÃES

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NA QUALIDADE DO SÊMEN
BOVINO CRIOPRESERVADO**

Dissertação apresentada para a obtenção
do grau de mestre em Ciências Animal
junto à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração
Produção Animal

Orientador: Dr. José Robson Bezerra Sereno – Embrapa/CPAC

Comitê de Orientação
Dr. Carlos Frederico Martins – Embrapa Cerrados
Profª Drª Maria Clorinda Soares Fioravanti - UFG

GOIÂNIA

2011

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

Guimarães, Cátia Oliveira.
G963e Efeito da adição de antioxidantes na qualidade do sêmen
criopreservado de bovino [manuscrito] / Cátia Oliveira
Guimarães. - 2011.
67 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. José Robson Bezerra Sereno; Co-
orientadores: Prof^ª. Dr^ª. Maria Clorinda Soares Fioravanti e
Dr. Carlos Frederico Martins.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Bovino – Sêmen - Criopreservação. 2. Sêmen bovino
– Antioxidante. I. Título.

CDU: 636.2:591.463.1

Dedico aos meus pais Cleber Moraes Guimarães e Albertina Gonçalves de Oliveira Guimarães, aos meus irmãos Caio Oliveira Guimarães e César Oliveira Guimarães pelo apoio e conselhos em todos os momentos da minha vida.

Ao Lucas Jacomini Abud uma pessoa especial, que está sempre ao meu lado e que me ajuda a superar todos os desafios nesta caminhada e que continuará por toda a vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente, por me dar a vida, iluminar-me, dar saúde, sabedoria e por sempre colocar pessoas especiais que me apoiam, ensinam e incentivam a seguir em frente, buscando realizar meus sonhos e por fim ter me dado esta família que está sempre ao meu lado.

Aos meus pais, Cleber Moraes Guimarães e Albertina Gonçalves de Oliveira Guimarães e aos meus irmãos Caio Oliveira Guimarães e César Oliveira Guimarães que sempre estão do meu lado dando forças, conselhos e apoio.

Agradeço aos amigos: Aline Luciana Rodrigues, Anna Carolina Costa, Geisa Isilda Ferreira Esteves, Liliane Pinheiro Cabral, Marianna Gomes (cunhada e amiga) e Gustavo Lage Costa por todos os momentos vividos juntos.

Agradeço a pesquisadora Dra. Margot Alves Nunes Dode e José Carvalho de Oliveira Neto pelos ensinamentos e auxílio nas avaliações de fluorescência e pelas fotos cedidas. À toda equipe do laboratório de Reprodução Animal da USP, Marcílio Nichi, Mariana, Andressa Dalmazzo, Carol e Francisco Ayres pelos ensinamentos e auxílio nas atividades. Ao colega Juaci Malaquias, estatístico da Embrapa Cerrados, pela disponibilidade e toda contribuição dada na parte estatística do trabalho.

A todos os funcionários da Escola de Veterinária e da Embrapa Cerrados.

Ao meu orientador Dr. José Robson Bezerra Sereno e Co-orientadores Dr. Carlos Frederico Martins e Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti pelos ensinamentos.

Agradeço às Instituições Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Embrapa Cerrados, Cenargen, UnB, USP e ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

E finalmente, ao Lucas Jacomini Abud meu companheiro de todos os momentos, uma pessoa muito especial, compreensiva, atenciosa, verdadeira e que me faz muito feliz.

“Cada um tem de mim exatamente o que cativou, e cada um é responsável pelo que cativou, não suporto falsidade e mentira, a verdade pode machucar, mas é sempre mais digna. Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão. Perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve e a vida é muito para ser insignificante. Eu faço e abuso da felicidade e não desisto dos meus sonhos. O mundo está nas mãos daqueles que têm coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos.”

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Criopreservação de sêmen.....	3
2.2 Radicais livres.....	4
2.3 Antioxidantes	6
2.4 Vitamina E	7
2.5 Catalase.....	9
2.6 Piruvato de Sódio	10
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo geral.....	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Locais e período de experimentação	13
4.2 Animais e Manejo	13
4.3 Colheita e Avaliação do Sêmen Pré-Criopreservação.....	14
4.4 Delineamento Experimental.....	15
4.5 Preparo das soluções de antioxidantes	15
4.6 Criopreservação do sêmen.....	16
4.7 Avaliação do Sêmen Pós criopreservação	17
4.7.1 Análise computadorizada da motilidade (CASA).....	17
4.7.2 Análise da morfologia espermática	18
4.7.3 Análise da integridade de membrana plasmática e reação acrossomal.....	19
4.7.4 Avaliação da resistência ao estresse oxidativo induzido	21
4.7.5 Avaliação da atividade mitocondrial	22
4.8 Análise Estatística	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXOS.....	53
Anexo 1.....	53

Anexo 2.....	54
Anexo 3.....	55
Anexo 4.....	56

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1 - Touros da raça Nelore utilizados para a colheita de sêmen durante o experimento	14
FIGURA 2 - Aparelho TK 3000 utilizado para a criopreservação das amostras de sêmen	17
FIGURA 3 - Equipamento Computer Assisted Semen Analysis (CASA) utilizado para avaliar os parâmetros cinéticos de movimentos das amostras de sêmen bovino	18
FIGURA 4 - Espermatozóides corados com diacetato de 6 carboxifluoresceína e iodeto de propídeo, demonstrando membrana plasmática íntegra (A) e membrana plasmática lesada (B e C).....	20
FIGURA 5 - Fotografias em microscópio de contraste de fase e epifluorescência do mesmo campo de leitura. Espermatozóides morto com acrosssoma reagido (A), vivo sem reação acrosssomal (B) e morto sem reação acrosssomal (C).	21

LISTA DE TABELA

TABELA 1 - Aspectos físicos e morfológicos do sêmen in natura dos touros Nelore, utilizados no experimento na Embrapa Cerrados.	25
TABELA 2 - Médias e desvio padrão dos parâmetros da cinética espermática: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN), obtidos pelo sistema de análise computadorizada (CASA) do sêmen bovino criopreservado com diferentes antioxidantes e concentrações.....	27
TABELA 3 - Médias e desvio padrão da integridade de membrana plasmática do sêmen bovino criopreservado com diferentes antioxidantes e concentrações	31
TABELA 4 - Porcentagem de espermatozoides vivos com acrossomo reagido, vivos sem reação acrossomal, mortos com acrossomo reagido e mortos sem reação acrossomal, das amostras de sêmen pós descongelação nos diferentes tratamentos com antioxidantes.....	33
TABELA 5 - Efeito dos tratamentos antioxidantes sobre a porcentagem (média \pm desvio padrão) de espermatozoides classes I,II,III,IV na avaliação da atividade mitocondrial das amostras do sêmen bovino criopreservado. ...	35
TABELA 6 - Efeito dos tratamentos antioxidantes sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ng/milhão de células espermáticas) das amostras do sêmen bovino criopreservado.	36
TABELA 7 - Coeficientes de correlação entre as variáveis resposta da integridade de membrana das células íntegras (INT), e lesada (LES); reação acrossomal, com reação (CR) e sem reação (SR); concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) , células classe I, II, III, IV da atividade mitocondrial (DABI, DABII, DABIII, DABIV) das amostras do sêmen bovino criopreservado.	37

RESUMO

Os antioxidantes têm como função neutralizar os efeitos dos radicais livres proporcionando uma melhor qualidade do sêmen fresco e criopreservado. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da adição dos antioxidantes catalase, α -tocoferol e piruvato de sódio no sêmen bovino visando um controle das espécies reativas de oxigênio para melhorar a qualidade espermática pós-criopreservação. Foram utilizados seis touros adultos da raça Nelore selecionados previamente entre outros animais por meio da avaliação de condição corporal e exame andrológico. O sêmen foi coletado e imediatamente avaliado quanto a motilidade e vigor no laboratório. Em seguida, o sêmen foi diluído com o meio Tris-gema-glicerol com as moléculas antioxidantes nas diferentes concentrações. O trabalho foi estruturado em quatro grupos experimentais: Grupo 1 (controle sem adição de antioxidantes); grupo 2 (com antioxidante catalase em três concentrações 20 UI, 80 UI e 200 UI); grupo 3 (com antioxidante α -tocoferol nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M) e o grupo 4 (com antioxidante piruvato de sódio nas concentrações de 1.5 μ M, 3.5 μ M e 5 μ M). Após a descongelação foram realizadas as análises computadorizada (CASA) da motilidade, da integridade de membrana plasmática, de integridade acrossomal, da atividade mitocondrial e mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Observou-se que os antioxidantes não tiveram efeito significativo na maioria dos parâmetros avaliados, porém nas menores concentrações tiveram melhor resultado comparando-se com o grupo controle para os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva, velocidade de trajeto e integridade de membrana. Em relação a avaliação de TBARS observou-se que as maiores concentrações dos antioxidantes têm menor peroxidação lipídica. Desta forma, tornam-se necessárias mais pesquisas em relação a avaliação funcional dos espermatozoides, bem como a identificação da concentração ideal que beneficie todos os parâmetros espermáticos pós-descongelação.

Palavras chave: alfa tocoferol, catalase, criopreservação, espermatozoides, piruvato de sódio, radicais livres, touro.

ABSTRACT

The function of antioxidants is control the free radicals to improve the quality of fresh and cryopreserved semen. The objective this work was to study the effect of antioxidants catalase, α -tocopherol and sodium pyruvate added in bull semen in order to control the reactive oxygen species and improve sperm quality after cryopreservation. Were used six adult Nelore bulls previously selected from other animals by evaluation of body condition and andrological examination. Semen was collected and immediately evaluated for motility and vigor at the laboratory. After, the semen were diluted with Tris-egg yolk-glycerol medium with the antioxidants molecules in different concentrations. The work was divided into four experimental groups: Group 1 (control without addition of antioxidants), Group 2 (with catalase antioxidant in three concentrations 20 IU, 80 IU and 200 IU), Group 3 (with α -tocopherol antioxidant in the concentrations of 50 mM, 100 mM and 150 mM) and Group 4 (with sodium pyruvate antioxidant in the concentrations of 1.5 mM, 3.5 mM and 5 mM). After semen thawing the computerized analysis (CASA) of motility, plasm membrane, and acrosome integrity, mitochondrial activity and measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). It was observed that the antioxidants had no significant effect on most parameters measured, but the lower antioxidants concentrations were more efficient than the control group for the total motility, progressive motility, average path velocity, and plasm membrane integrity parameters. In the TBARS evaluation was observed lower lipid peroxidation when higher antioxidants concentrations were used. Thus more research is needed to determine the functionality of sperm, as well as indentify the optimal concentration of the antioxidants that benefits all sperm parameters after thawing.

Keywords: α -tocopherol, bull, catalase, cryopreservation, free radicals, sodium pyruvate, sperm.

1. INTRODUÇÃO

As biotecnologias reprodutivas podem ser utilizadas para aumentar a produção na pecuária, buscando maior produtividade por hectare, para diminuir os custos de produção. Estas tecnologias utilizadas normalmente são inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e fecundação *in vitro* (FIV). As duas últimas dependem da disponibilidade de gametas viáveis, podendo ser provenientes do sêmen criopreservado ou fresco.

Sabe-se que a congelação de sêmen apresenta muitas vantagens, dentre elas se destacam: a utilização de sêmen de animais não adaptados às condições ambientais, aumento da vida reprodutiva dos machos, possibilidade da comercialização nacional e internacional do sêmen, criopreservação do sêmen de animais que morreram para evitar a perda de material genético (MARTINS et al., 2007) e a criação de bancos de germoplasma para a preservação de materiais genéticos. Neste sentido torna-se necessário estudar o desenvolvimento e a introdução de novas substâncias que auxiliem na preservação das células para aumentar a porcentagem de espermatozóides viáveis.

Em condições naturais de acasalamento, os espermatozóides estão em ambiente anaeróbica, assim os potenciais danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) são reduzidos. Porém, quando o sêmen é manipulado para uso na inseminação artificial ele é exposto ao oxigênio e vários passos no seu processamento podem levar a produção de EROs, bem como a redução dos antioxidantes naturais (MAIA, 2006). Assim, a retirada do plasma seminal, diluição do sêmen, as manipulações feitas no laboratório para o processamento como pipetagem e centrifugação e o processo de separação de gametas na sexagem favorecem a incorporação do oxigênio com produção de radicais livres que atuam nas membranas celulares desencadeando o processo de peroxidação.

As mudanças de temperatura durante os processos de congelação e descongelação a que estas células são submetidas ocasiona o choque térmico, que determina a morte de muitos espermatozoides. Ainda, nestes processos muitos são danificados, alterando sua viabilidade e conseqüentemente comprometendo sua fertilidade. Acredita-se que a fertilidade espermática pode

ser reduzida devido às baixas temperaturas de criopreservação, bem como devido às grandes quantidades de EROs liberadas pelos espermatozóides danificados e mortos (BALL et al., 2001).

Com o aumento do número de células viáveis após o processamento do material é possível diminuir a concentração de espermatozóides por palheta, assim aumenta-se o número de palhetas produzidas por reprodutor e conseqüentemente diminui o valor da dose tornando-se mais acessível para os produtores.

O estudo dos antioxidantes, os quais se constituem na primeira linha de combate às EROS, para melhoria da qualidade do sêmen a fresco e principalmente criopreservado, torna-se de fundamental importância para desenvolver protocolos padrões e aplicáveis, uma vez que existem muitas controvérsias, em relação aos tipo de molécula antioxidante e às doses, o momento adequado para ser acrescentado e possíveis interações destes com os diferentes meios de criopreservação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Criopreservação de sêmen

A criopreservação baseia-se na interrupção do metabolismo celular com a conservação das estruturas celulares íntegras e do seu potencial de fecundação por períodos prolongados (AMANN & PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990). Portanto, a interação dos espermatozóides com o meio de criopreservação é de grande importância, pois seus constituintes afetam a integridade das células e conseqüentemente sua viabilidade e habilidade de fecundação (MANJUNATH et al., 2002).

As interações entre diluidor, crioprotetor, curva de resfriamento, congelação e descongelação visam minimizar os danos causados pelo choque frio, formação de cristais de gelo e desidratação celular e por fim obter sucesso na preservação das estruturas espermáticas (AMANN & PICKETT, 1987).

No processo de congelação e descongelação os espermatozóides estão sujeitos ao estresse químico, osmótico, térmico, mecânico (RASUL et al., 2001) e oxidativo (CHATTERJEE & GAGNON 2001), que podem causar lesões celulares diretas que afetam estruturalmente as organelas (ruptura de membranas) ou indiretas que provocarão alterações nas funções celulares através do processo metabólico (HOLT, 2000). O estresse oxidativo causado pela ação das espécies reativas ao oxigênio provoca danos estruturais à biomoléculas, DNA, lipídeos, carboidratos e proteínas, assim como a outros componentes celulares (HALLIWELL, 1991).

Apesar da criopreservação ser a principal biotecnologia que permite o transporte, a conservação e posterior utilização do sêmen, esta técnica provoca inúmeras lesões na célula espermática, sendo o estresse oxidativo um dos principais fatores que danificam os espermatozóides (WANG, 1997). Portanto, a adição de antioxidantes aos diluidores de congelação, tem sido empregada em várias espécies, com o intuito de minimizar ou reverter os efeitos deletérios aos espermatozoides, produzidos pelos metabólitos reativos do oxigênio, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxila (OH^\cdot) (SOBRINHO, 2009).

2.2 Radicais livres

Radicaís livres são moléculas ou átomos instáveis e altamente energéticos, que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica e são capazes de existir de forma independente (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNER, 2001). Eles são formados por fontes de energia externa (luz, calor e radiação) ou interna (metabolismo), em reações catalisadas por metais (ferro e cobre) ou enzimas. Assim, no organismo a produção de radicaís livres e outras espécies reativas ocorre naturalmente durante o metabolismo e a respiração celular (BORGES, 2008).

Baixas concentrações de radicaís livres são importantes para os processos bioquímicos e para as funções espermáticas normais, porém quando há uma produção superior à capacidade das células em neutralizar estes compostos, haverá distúrbios celulares e metabólicos, sendo altamente tóxicos às células (MICHAEL et al., 2007).

No meio científico utilizam-se os termos espécies oxigênio reativo (ROS) ou espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) para incluir todos os radicaís e não radicaís derivados do oxigênio e as espécies reativas de nitrogênio (ENR) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNER, 2001).

As ROS mais importantes encontradas em todos os sistemas biológicos são: radical hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido ($\text{O}^{\cdot-}$), óxido nítrico (NO) e o não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O radical hidroxila é a espécie mais reativa do oxigênio, portanto é prejudicial as células, podendo ser formada por meio do peróxido de hidrogênio e através da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico, que produz o peróxinitrito (OONO^\cdot), que se decompõe em dióxido de nitrogênio (NO_2) e na hidroxila (HALLIWELL, 1991). Este radical ao ser produzido próximo do DNA pode provocar mudanças nas bases purínicas e pirimídicas e conseqüentemente mutação ou inativação do DNA. Além disto, nas membranas celulares pode acontecer a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, ocasionando rupturas nas membranas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Segundo NORDBERG & ARNÉR (2001) o anion superóxido é formado a partir da adição de um elétron ao oxigênio molecular. Ele é gerado principalmente na membrana mitocondrial, sendo espontânea sua formação na cadeia respiratória. O radical é pouco reativo e não tem habilidade de penetrar em membranas lipídicas, agindo apenas no local onde é produzido.

O peróxido de hidrogênio é gerado através da dismutase enzimática ou não enzimática do ânion superóxido (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). É um metabólito extremamente deletério do oxigênio, pois participa da formação do OH (MAIA, 2006). Este metabólito atravessa as membranas biológicas com facilidade e possui vida longa, podendo ser removido pelos antioxidantes enzimáticos (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Nos espermatozóides o H₂O₂ inibe a produção de energia (ATP), o que ocasiona a diminuição da motilidade (ARMSTRONG et al., 1999), porém não afeta a viabilidade (BILODEAU et al., 2002).

Com relação ao óxido nítrico, ele tem pouca reatividade com as biomoléculas, porém reage facilmente com outros radicais livres e gera moléculas menos reativas. O óxido nítrico inibe a peroxidação de lipídeos nas membranas celulares (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

As ROS degradam a membrana plasmática por um processo denominado de lipoperoxidação, no qual os fosfolipídios insaturados, glicolipídios e o colesterol presentes nas membranas celulares são os principais alvos da oxidação (GIROTTI, 1998).

Portanto, os espermatozóides são muito sensíveis à oxidação, devido à alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu reduzido citoplasma (VERNET et al., 2004; SHARMA & AGARWAL, 1996). Desta forma, o plasma seminal tem importante função, pois contém enzimas e moléculas como a vitamina E que são capazes de evitar o ataque das ROS (BARROS, 2007).

A oxidação é um processo comum sofrido pelos sistemas biológicos em condições aeróbicas (GARRIDO et al., 2004). O desequilíbrio entre as moléculas antioxidantes e as ROS resulta o estresse oxidativo (MAIA, 2006). Este ocasiona a diminuição da fertilidade do sêmen criopreservado (TRINCHEIRO et al., 1990; BILODEAU et al., 2002), pois provoca danos na membrana plasmática, no DNA dos espermatozoides, alterações estruturais do acrossomo, alterações

metabólicas, perda irreversível da motilidade e dano na capacidade respiratória (OCHSENDORF, 1999).

As células espermáticas criopreservadas perdem a qualidade devido ao estresse oxidativo (MAZZILLI et al., 1995; WANG et al., 1997; THOMSON et al., 2009; ZRIBI et al., 2010), que desencadeia a peroxidação lipídica que ocorre principalmente na peça intermediária e em menores proporções na parte posterior da cauda e na cabeça do espermatozóide (BROUWERS & GADELLA, 2003).

Segundo SOBRINHO (2009) não se sabe o momento que os ROS têm maior atuação, ou seja, se durante a refrigeração ou no período de congelação, sendo necessários mais estudos para determinar o período mais crítico no qual as células sofrem danos oxidativos.

2.3 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações, comparadas a do substrato oxidável, retardam ou previnem a oxidação deste substrato (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Estas substâncias protegem a membrana plasmática dos espermatozóides criopreservados, mantendo sua atividade metabólica e viabilidade (BECONI et al., 1993).

As propriedades ideais de um antioxidante consistem em ter baixa capacidade de perder ou ganhar elétrons e de reagir com o oxigênio, ter atividade antioxidante mesmo em pequenas quantidades, poder ser reciclada direta ou indiretamente por sistemas enzimáticos e apresentar menor energia de ativação que as moléculas oxidáveis (BUETTNER, 1993).

A atuação dos antioxidantes consiste no fornecimento de hidrogênio para o radical livre com o objetivo de estabilizá-lo. Assim o antioxidante torna-se um radical livre, porém com sua capacidade de reajustar-se em um conjunto estável interrompe a reação de propagação (SWENSON et al., 1996).

As células possuem um sistema de defesa antioxidante enzimático e um não enzimático, que as protege do efeito letal das ROS. O sistema enzimático é composto por superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT), glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx). O sistema não enzimático fazem parte um grande número de compostos de baixo peso molecular que inclui

as vitaminas C e E, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Os sistemas enzimáticos e não enzimáticos podem atuar em duas linhas: como removedor/varredor do agente antes que ele cause lesão (glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e vitamina E) ou como reparador da lesão ocorrida (ácido ascórbico, glutathione reductase - GR e glutathione peroxidase - GPx). Estes antioxidantes encontram-se no meio intracelular, com exceção da vitamina E que é um antioxidante estrutural da membrana (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

As células espermáticas durante o período de maturação perdem a maioria do seu citoplasma e com isto perdem parte dos antioxidantes endógenos, ficando vulneráveis à ação de EROs (CARVALHO et al., 2002). Porém, esta perda é compensada pelo plasma seminal que contém enzimas e moléculas antioxidantes (PASQUALOTTO et al., 2000). Este sistema antioxidante é crucial para a manutenção da integridade da membrana espermática e para as propriedades fisiológicas, incluindo fluidez de membrana, flexibilidade e permeabilidade necessária para o processo de fecundação (RUTZ et al., 2007). Um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs no sêmen causa efeitos prejudiciais aos espermatozoides, assim justifica-se a utilização de antioxidantes exógenos, que se constituem na principal defesa contra o estresse oxidativo induzido pelos radicais livres (AGARWAL et al., 2005).

Tem sido estudado a adição de vários antioxidantes aos espermatozoides como a catalase, ácido ascórbico, piruvato de sódio, superóxido dismutase, glutathione reductase e oxidase, hipotaurina, trolox, vitamina C, acetil cisteína e urato (AURICH et al 1997; HUGHES et al., 1998; CALAMERA et al , 2001; PEÑA et al., 2003; ROCA et al., 2005; KLINC & RATH, 2007; FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2007; PEIXOTO et al., 2008; SILVA et al., 2008; BECCAGLIA et al., 2009; SARIOZKAN et al., 2009; THIANGTUM et al., 2009).

2.4 Vitamina E

A vitamina E (α -tocoferol) é uma molécula lipossolúvel, presente nas membranas de organelas e ligada a complexos protéicos (ERNSTER et al., 1992).

Ela contém um grupo hidroxila através do qual reage com elétrons desemparelhados, podendo assim, reduzir radicais peróxil (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Portanto, é considerada um antioxidante estrutural da membrana (FERREIRA & MATSUBARA, 1997) que previne a reação oxidativa em cadeia (MATÉS, 2000).

A denominação vitamina E é um termo nutricional que se refere a um grupo de tocoferóis e tocotrienóis com atividade antioxidante. Existem oito moléculas naturais que apresentam atividade antioxidante, sendo quatro tocoferóis (α , β , γ , δ) e quatro tocotrienóis (α , β , γ , δ) diferenciadas de acordo com a posição do grupo metil no anel cromanol (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O α -tocoferol está presente na bicamada lipídica das membranas celulares (MARZZOCO & TORRES, 2007) e é considerado o antioxidante lipossolúvel mais efetivo, sendo a forma de α -tocoferol mais ativa e amplamente distribuídas nos tecidos e plasma. Esta substância tem o papel importante de proteger as membranas celulares contra danos causados por radicais livres (BRAMLEY et al., 2000; SILVA & NAVES, 2001; SILUK et al., 2007; TRABER & ATKINSON, 2007). Esta molécula protege as células de radicais de oxigênio, *in vivo* e *in vitro* e acredita-se que ela é o inibidor primário de radicais livres encontrados em pequenas quantidades nas membranas celulares e no plasma seminal de mamíferos (SIKKA, 2004).

A propriedade antioxidante da vitamina E consiste no bloqueio da oxidação dos ácidos graxos insaturados das membranas celulares, ou seja, diminuição da lipoperoxidação (MARZZOCO & TORRES, 2007). Esta substância ao oxidar interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica de biomembranas e lipoproteínas (BARROS, 2007), não necessitando estar ligada a outra substância (CHOW, 1989; FARISS, 1991). Seu mecanismo de ação consiste na destruição do radical hidroxila (BJORNEBOE et al., 1990).

A vitamina E natural está sujeita a destruição por oxidação que pode ser acelerada pelo calor, umidade, gordura rancificada, luz, álcali e microminerais (cobre e ferro). A esterificação da vitamina E aumenta sua estabilidade, por isso formas comerciais usualmente contêm acetato, são muito estáveis a oxidação e não possui atividade antioxidante *in vitro* (MCDOWELL et al., 2000).

Segundo BOLLE et al. (2002) esta molécula ao ser utilizada como antioxidante pode atuar de forma favorável ou desfavorável, dependendo da dose ou da concentração utilizada. BECONI et al. (1993) afirmam que a viabilidade celular e atividade metabólica dos espermatozóides podem ser protegidas pela vitamina E. SOBRINHO (2009) não constatou proteção sobre a motilidade, vigor, porcentagem de espermatozóides com membrana e acrossomo íntegros. Assim, verifica-se que na literatura existem controvérsias a respeito da utilização desta molécula, necessitando assim de maiores estudos.

2.5 Catalase

A catalase é um antioxidante enzimático que faz parte do sistema de defesa contra a peroxidação lipídica, sendo importante para a manutenção da motilidade e viabilidade espermática (GADEA et al. 2004). É uma das mais eficientes enzimas conhecidas, pois não pode ser saturada por nenhuma concentração de seu substrato (MATÉS & SÁNCHEZ-JIMENEZ, 1999).

Esta enzima tem como função prevenir a formação da hidroxila a partir do H_2O_2 , pois ela catalisa a redução do H_2O_2 que produzirá água e o oxigênio molecular. A catalase é encontrada na célula espermática e no plasma seminal de humanos, ratos e coelhos (DANDEKAR et al., 2002).

A molécula de catalase mantém os ROS em níveis basais (CALAMERA et al., 2001), ao ser utilizada individualmente ou combinada com outros antioxidantes. No diluidor de sêmen é capaz de neutralizar os ROS gerados durante o processo de criopreservação, reduzindo os efeitos nocivos do estresse oxidativo, permanecendo o sêmen descongelado com boas condições (LAMIRANDE et al., 1998; O'FLAHERTY et al., 1999).

Em espermatozóides bovinos a catalase se torna um antioxidante de grande importância, pois segundo BILODEAU et al. (2002) estas células são pouco adaptadas para metabolizar o H_2O_2 . Como os radicais livres estão envolvidos com a capacitação espermática e reação acrossomal, altos níveis destes radicais poderão desencadear estes eventos antecipadamente. De acordo com AITKEN et al. (1996) a capacitação de espermatozóides bovinos é inibida na presença deste antioxidante.

AURICH et al. (1997) verificaram que a catalase pode atuar sobre a qualidade do sêmen de eqüino de forma negativa ou positiva, pois em alta concentração diminuiu a percentagem de espermatozóides com membranas íntegras e a motilidade progressiva, já em menores concentrações preservou as células.

Em diferentes espécies de animais a utilização da catalase no meio de diluição para a criopreservação de sêmen melhorou os parâmetros espermáticos (MAXWELL & STOJANOV, 1996; ROCA et al., 2005; FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2007; MICHAEL et al., 2007). Segundo ROCA et al. (2005) a catalase preservou a motilidade total, progressiva e a percentagem de espermatozóides viáveis com acrossoma íntegro após a descongelação. Já ROSSI et al. (2001) e THIANGTUM et al. (2009) não constataram preservação dos parâmetros de cinética de movimento, de integridade de membrana plasmática e acrossomal.

Verifica-se que na literatura há uma grande variedade de resultados em relação a utilização do antioxidante para a preservação dos espermatozóides, podendo tal fato ser decorrente dos diferentes meios de criopreservação, concentrações, das diferenças de constituição do plasma seminal de cada espécie e do momento em que o antioxidante é adicionado ao meio.

2.6 Piruvato de Sódio

A atuação do piruvato como antioxidante deve-se à sua estrutura química e à sua ação metabólica. A estrutura de alfa-cetoácido permite ao piruvato neutralizar peróxidos em uma reação química direta, não-enzimática, em que os peróxidos são reduzidos a alcoóis conjugado e o piruvato é decomposto em acetato e CO_2 (MALLET et al., 2005).

O piruvato tem sido reconhecido como removedor do H_2O_2 no sistema celular promovendo a proteção contra danos oxidativos (O'DONNELL-TORMEY et al., 1987; VARMA et al., 1990; SALAHUDEEN et al., 1991; LONG & HALLIWELL, 2009). A degradação do H_2O_2 pelo piruvato foi reportada primeiramente por Holleman em 1904 e nesta destruição não ocorre liberação do O_2 (MELZER & SCHMIDT, 1988). Assim, este composto torna-se importante para a proteção dos espermatozóides criopreservados, uma vez que na sua presença

não haverá formação de oxigênio no meio diluente, porém o piruvato é consumido durante a reação de degradação do H_2O_2 . Por esta razão deve utilizá-lo associado a outro antioxidante (UPRETI et al., 1998).

Foi determinado que em altas concentrações o piruvato agiu como um antioxidante para espermatozóides ovinos (UPRETI et al., 1998) e de células somáticas (O'DONELL-TORMEY et al. 1987; MEYER et al., 1996; MAZZIO & SOLIMAN, 2003). Em espermatozóides de garanhão o piruvato na concentração de 2 mM manteve-os com boa motilidade. Já em concentrações de 10 mM reduz a motilidade e a velocidade da célula espermática eqüina (BRUEMMERT et al., 2002) e de humanos (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992).

Além da ação antioxidante o piruvato, em concentração de 0,02 mM, pode ser utilizado no diluente como substrato energético para espermatozóides (BAVISTER et al., 1969), pois ele pode mover-se livremente no citoplasma e nas mitocôndrias das células. Assim, o piruvato é importante para o processo de congelação e descongelação, uma vez que os espermatozóides necessitam de energia para superar o estresse provocado durante este processo (FABBROCINI et al., 2000).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito da adição dos antioxidantes catalase, o α -tocoferol e piruvato de sódio no sêmen bovino diluído em meio Tris-gema-glicerol, visando o controle das espécies reativas ao oxigênio e a melhora da qualidade espermática pós-criopreservação.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar qual o melhor antioxidante a ser adicionado ao sêmen para protegê-lo das espécies reativas ao oxigênio no processo de criopreservação.

- ✓ Determinar a concentração de antioxidante que garanta uma maior viabilidade espermática.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais e período de experimentação

As atividades de colheita, avaliação prévia do sêmen e criopreservação foram desenvolvidas no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Cerrados. As avaliações de integridade de membrana plasmática e acrossomo, bem como a avaliação da cinética do movimento espermático por meio do CASA foram realizadas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A avaliação da resistência ao estresse oxidativo induzido e a atividade mitocondrial foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade de São Paulo. O período de experimentação e avaliação transcorreu de julho de 2010 a fevereiro 2011.

4.2 Animais e Manejo

Foram utilizados seis touros adultos da raça Nelore, com idade entre três a cinco anos, selecionados previamente por meio da avaliação de condição corporal e exame andrológico. Os animais selecionados apresentavam no mínimo 70% de motilidade espermática, vigor 3 (0-5) e menos de 30% de patologias espermáticas totais. Estes animais foram mantidos a pasto, com água e sal mineral *ad libitum*. O controle de ectoparasitas e endoparasitas, bem como as vacinações obrigatórias foram realizadas regularmente seguindo o calendário profilático-sanitário estabelecido pela Embrapa Cerrados.



FIGURA 1 - Touros da raça Nelore utilizados para a colheita de sêmen durante o experimento

4.3 Colheita e Avaliação do Sêmen Pré-Criopreservação

Dois meses antes do início do experimento os animais foram adaptados à colheita de sêmen por meio de eletroejaculação. Antes de cada colheita a região externa do prepúcio foi higienizada com água e sabão neutro e para a higienização interna utilizou-se solução de Kilol (Kilol-L Higienizante – Quinabra), para evitar possíveis contaminações do sêmen.

Durante o experimento coletou-se um touro por dia. Após a colheita o sêmen foi imediatamente levado ao laboratório, determinado o volume do ejaculado em tubo graduado, mantendo-o em banho-maria a 37°C até seu processamento final, para evitar o choque térmico e alterações das características seminais. A motilidade e o vigor foram analisados subjetivamente, colocando-se 10 µl de sêmen entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C, avaliando em microscópio de contraste de fase (Nikon Biophot) com aumentos de 100 e 400x.

Atribuiu-se a motilidade valores de 0-100%. O vigor foi classificado em uma escala de 0-5, sendo o escore 1 o mais lento e o escore 5 correspondendo ao mais rápido movimento.

A concentração foi avaliada coletando-se uma amostra do sêmen e diluindo-a na proporção 1:200, na solução de formol-salina tamponada. A contagem espermática foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio de contraste de fase com aumento de 400x.

Para a avaliação da morfologia espermática uma alíquota de sêmen foi diluída em formol-salina tamponada, previamente aquecida (37°C), para fixação e avaliada posteriormente.

4.4 Delineamento Experimental

Para avaliar a influência individual dos antioxidantes e a melhor concentração de cada molécula testada foram utilizados quatro grupos experimentais: Grupo 1 – Controle, sem adição de antioxidantes; Grupo 2 - catalase nas três concentrações de 20 UI, 80 UI e 200 UI; Grupo 3 - α -tocoferol (análogo da Vitamina E) nas três concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M e Grupo 4 - piruvato de sódio nas concentrações de 1.5 μ M, 3.5 μ M e 5 μ M.

4.5 Preparo das soluções de antioxidantes

As soluções estoque de antioxidantes foram preparadas antes de cada colheita, protegidas da luz e armazenadas na geladeira até o momento da diluição no meio de congelação Tris gema glicerol. Antes da colheita do sêmen o meio de crioprervação foi dividido em 10 porções e acondicionados em tubos cônicos de 15 ml para receberem as diferentes concentrações das três moléculas antioxidantes.

Para o preparo da solução estoque de catalase (Sigma-C 9322) com 17500 UI/ml diluiu-se o reagente em solução tampão de fosfato de sódio de 50 mM em pH 7,0. Calculou-se o volume em microlitros da solução estoque para ser adicionado ao meio TRIS de forma que as concentrações nas palhetas fossem de 20, 80 e 200 UI.

Na solução estoque de piruvato de sódio (Sigma-P5280) foi utilizado uma solução tampão de fosfato de sódio de 50 mM em pH 7,0 para a diluição do reagente de forma a obter uma solução estoque de 10 mM. E posteriormente acrescentar ao meio Tris-gema-glicerol para obter soluções de 1,5; 3,5 e 5,0 μ M por palheta.

O α -tocoferol (Sigma-T3251) foi diluído com Etanol (Merck) tendo-se uma solução estoque de 15 mM que foi diluída no diluente Tris-gema-glicerol para obter uma concentração final de 50, 100 e 150 μ M por palheta.

4.6 Criopreservação do sêmen

Após a avaliação da motilidade, vigor e do cálculo da concentração espermática, o ejaculado foi dividido em dez alíquotas (tratamentos) de mesmo volume, em tubos cônicos de 15 ml. O ejaculado foi diluído utilizando-se o diluidor TRIS (Anexo 1) com os diferentes antioxidantes nas diferentes concentrações. A diluição foi realizada em banho maria à temperatura de 37°C, atingindo uma concentração de 20×10^6 espermatozóides/palheta. O diluidor Tris-gema-glicerol foi previamente preparado no laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Cerrados, depois mantido em freezer a -20°C.

Em seguida, o sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 ml que foram lacradas com seladora (Imap FM-15-SD). As palhetas foram previamente identificadas quanto ao antioxidante, concentração e número do touro.

Para o resfriamento e congelação do sêmen foi utilizado um sistema programável de criopreservação de sêmen portátil (modelo TK-3000), composto por um aparelho programável, equipado com um porta-palhetas de aço-inox, uma unidade ou tubo de resfriamento e uma caixa térmica para nitrogênio líquido, com uma bateria em casos de queda de energia.

As palhetas foram colocadas no porta-palhetas, o qual foi adicionado ao tubo de resfriamento, permanecendo até alcançar 5°C. O aparelho foi programado para realizar o resfriamento a partir da temperatura ambiente e seguindo uma curva de resfriamento de 0,25°C/min. até 5°C, com duração em torno de 1h e 30 min. e com tempo de equilíbrio de 2 horas. Ao final do tempo de equilíbrio, o porta-palhetas foi removido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido (nível de 7 cm), na qual realizou-se a curva (P1S1) de congelação com uma taxa de -20°C/min. de 5°C até -120°C.

Após atingir a temperatura de -120°C as palhetas foram removidas do porta-palhetas e imersas em nitrogênio líquido. Por fim, as palhetas foram acondicionadas em “racks” e então armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C),

em botijões criogênicos até o momento de realização das análises pós-descongelamento. Neste experimento foi criopreservado apenas um ejaculado por touro, e estes apresentaram motilidade igual ou superior a 70% e vigor 3 (escala de 1-5).



FIGURA 2 - Aparelho TK 3000 utilizado para a criopreservação das amostras de sêmen

4.7 Avaliação do Sêmen Pós criopreservação

Para cada análise realizada pós-descongelamento utilizou-se uma palheta de cada tratamento. As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Após descongelar o sêmen, este foi colocado em um microtubo de 1,5 ml (tipo Eppendorf), homogeneizado e avaliado quanto aos parâmetros da cinética do movimento pelo sistema computadorizado (CASA), integridade das membranas plasmática, integridade acrossomal por microscopia de epifluorescência (Axiophot Zeiss), peroxidação lipídica por leitura de absorbância e atividade mitocondrial em microscópio de contraste de fase.

4.7.1 Análise computadorizada da motilidade (CASA)

Esta análise foi realizada no sêmen criopreservado com a diluição de 20×10^6 spz/palheta logo após a descongelamento do sêmen. A amostra foi descongelada em banho maria a 37°C/ 30 segundos em seguida o material foi

transferido para um microtubo de 1,5 ml que foi mantido na mesma temperatura para posteriores avaliações. Retirou-se 2 μL da amostra que foi colocada na lâmina de leitura (câmara de Makler) previamente aquecida a 37°C. Utilizou-se o aparelho modelo Ivos-Ultimate 12 da Hamilton Thorne Biosciences, previamente ajustado (setup) para análise de sêmen bovino (Anexo 2). Este equipamento realiza a análise do sêmen por sistema computadorizado (*Computer Assisted Semen Analysis – CASA*), capturando a imagem da amostra por um microscópio acoplado a um computador e envia os dados para análise do movimento espermático através do programa *Animal Motility*. Realizou-se a escolha manual dos campos de leitura e análise, sendo selecionados os três melhores campos por amostra.

As características de movimento espermático analisadas foram: motilidade Total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

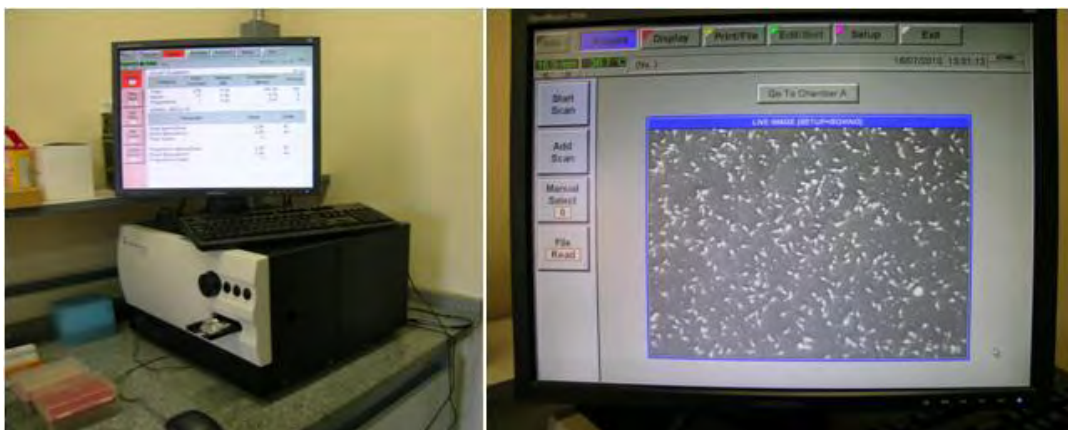


FIGURA 3 - Equipamento Computer Assisted Semen Analysis (CASA) utilizado para avaliar os parâmetros cinéticos de movimentos das amostras de sêmen bovino

7.7.2 Análise da morfologia espermática

Para a análise de morfologia espermática utilizou-se a técnica de câmara úmida. Para isso o sêmen diluído em formol salina tamponado, previamente aquecido (37°C), foi preparado uma câmara úmida, com uma gota do sêmen diluído entre lâmina e lamínula e a avaliação foi realizada pela contagem

de 200 células, em aumento de 1000x, sob microscopia de contraste de fase. As porcentagens das diversas anormalidades morfológicas foram agrupadas e classificadas em defeitos maiores e defeitos menores de acordo com o manual de andrologia do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

4.7.3 Análise da integridade de membrana plasmática e reação acrossomal

Para avaliação da integridade da membrana plasmática utilizou-se o diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) (Sigma C5041) e iodeto de propídio (IP) (Molecular Probe, Eugene, Oregon, EUA) conforme descrição de HARRISON & VICKERS (1990). Uma amostra de sêmen de 10 µl foi adicionada a 40 µl da solução trabalho (anexo 3) e incubadas por 10 minutos em microtubos protegidos da luz.

Uma alíquota de 7 µl de solução corante com o sêmen foi colocada em uma lâmina e coberta por uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: filtro com comprimento de onda de 395/420 nm de excitação/emissão). Foram contadas 200 células espermáticas, sendo classificadas de acordo com a coloração em: membrana íntegra (coloração verde) e membrana lesada (as células com coloração vermelha e as que coravam de verde e vermelho).

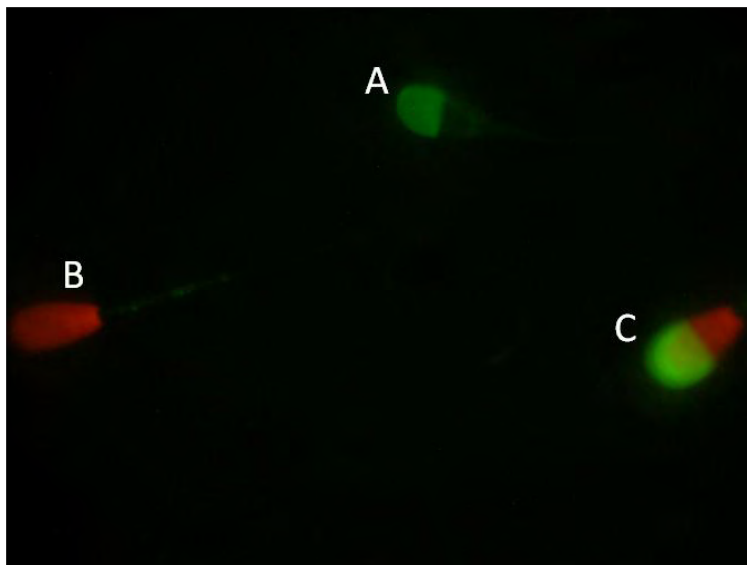


FIGURA 4 - Espermatozóides corados com diacetato de 6 carboxifluoresceína e iodeto de propídeo, demonstrando membrana plasmática íntegra (A) e membrana plasmática lesada (B e C).

Para a avaliação da integridade do acrossoma utilizou-se uma conjugação de isotiocianato de fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut agglutinin* – PNA) (L7381-Sigma) e IP, como descrito por KLINC & RATH (2007). Amostra de sêmen de 10 μ L foi adicionada a 30 μ L de solução trabalho (anexo IV) e incubada por 10 minutos.

Uma alíquota de 7 μ l de solução corante com o sêmen foi colocada em uma lâmina e coberta por uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: filtro de comprimento de onda de 494/517 nm de excitação/emissão). Foram contadas 200 células espermáticas, sendo classificados em quatro categorias: morto com acrossoma sem reação (coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração no acrossomo); morto com acrossoma reagido (coloração vermelha na cabeça e verde na região acrossomal); vivo com acrossoma não reagido (ausência de coloração na cabeça e acrossoma) e vivo com acrossoma reagido (ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde na região acrossomal).

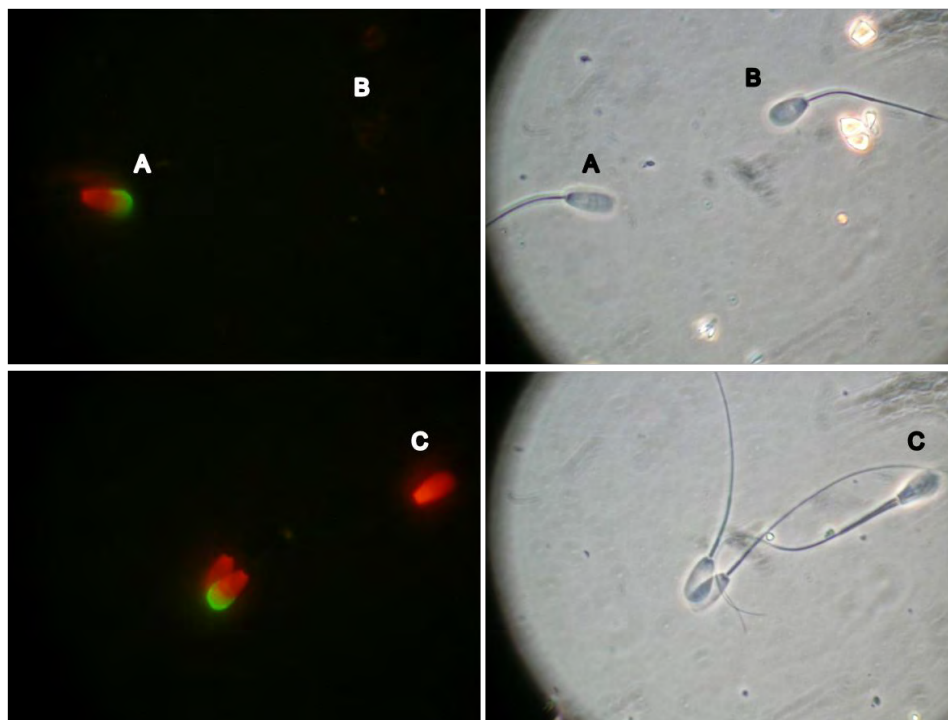


FIGURA 5 - Fotografias em microscópio de contraste de fase e epifluorescência do mesmo campo de leitura. Espermatozoides morto com acrosssoma reagido (A), vivo sem reação acrossomal (B) e morto sem reação acrossomal (C).

4.7.4 Avaliação da resistência ao estresse oxidativo induzido

Para verificar a suscetibilidade do espermatozóide ao estresse oxidativo utilizou-se a metodologia descrita por OHKAWA et al. (1979), que tem como fundamento a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (MDA), subproduto da peroxidação de lipídeos. Foi utilizado um sistema gerador de ROS com posterior mensuração da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) através da espectrofotometria.

As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C/30min e em seguida foi realizada a lavagem das amostras com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Após este procedimento pipetou-se 300 µl do sêmen lavado em um microtubo, onde foram adicionados 75 µl de ácido ascórbico e 75 µl de sulfato de ferro. Após incubou-se a solução por 90 minutos a 37°C para a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Após o período de incubação foram adicionados 900 µl de solução de ácido tricloroacético a 10% (TCA 10%) e as amostras foram centrifugadas por 15 min a 20.000 g, para precipitação de proteínas. Alíquotas de 600 µl do sobrenadante foram colocadas nos criotubos e congeladas para posteriormente serem avaliadas. Após todas as amostras do experimento estarem preparadas, descongelou-se e acrescentou-se 600 µl de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA1%), dissolvido em hidróxido de sódio (NaOH 0,05 M), preparado instantes antes de ser utilizado. Os tubos contendo esta mistura foram incubados em banho-maria (90-100°C) por 15 min. e resfriados imediatamente em banho de gelo, no intuito de parar a reação.

A concentração de TBARS foi quantificada através de leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 3300pro, Amersham Pharmacia), no comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão feita previamente com MDA.

O MDA é uma das principais substâncias que reage com o ácido tiobarbitúrico e a concentração de TBARS é determinada utilizando-se o valor $1,56 \times 10^5 \text{ x M}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do malondialdeído (BUEGE & AUST, 1978).

A concentração de TBARS nas amostras foi expressa em nanogramas de TBARS por 1×10^6 espermatozóides (ng/ 10^6 spz).

4.7.5 Avaliação da atividade mitocondrial

Para esta avaliação utilizou-se a técnica citoquímica que foi desenvolvida por HRUDKA (1987), a qual baseia-se na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo complexo citocromo C dependente da enzima citocromo C-oxidase (CCO). Esta enzima tem um papel fundamental no processo de respiração celular e metabolismo energético das células, além de ser pré-requisito para as funções osmóticas e sintéticas, para a motilidade e manutenção da estrutura celular.

Através da reação em cadeia o DAB é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, nas mitocôndrias. Esta deposição pode ser identificada através de microscopia convencional pela sua coloração marrom.

Desta maneira, é possível descrever o declínio espontâneo da CCO ocasionado por tratamentos físicos e/ou químicos a que os espermatozoides são submetidos.

Para realização desta técnica, uma alíquota de 20 µl de amostra foi incubada com 20 µl de DAB (1mg/ml de PBS), a 37°C, por uma hora. Após a incubação, foram realizados esfregaços em lâmina de vidro e estas fixadas em formol a 10% por 10 min, em seguida foram retiradas da solução para secar e protegidas da luz. As leituras das lâminas foram realizadas em microscópio de contraste de fase, sob aumento de 1000 vezes, em imersão. Foram contados 200 espermatozoides/lâmina e classificados de acordo com o grau de coloração da peça intermediária em quatro classes:

Classe I: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada, alta atividade mitocondrial;

Classe II: células espermáticas com segmentos corados (ativos) e não corados (inativos), havendo predominância dos ativos;

Classe III: células espermáticas com segmentos corados (ativos) e não corados (inativos), havendo predominância dos inativos;

Classe IV: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada, sem atividade mitocondrial.

4.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados em delineamento de blocos ao acaso, com dez tratamentos e seis blocos (bovinos), utilizou-se para a análise estatística o programa *Statistical Analysis System for Windows (SAS)*, versão 9.1.3. O efeito dos tratamentos sobre os parâmetros da motilidade espermática, integridade de membranas, reação acrossomal, peroxidação lipídica e atividade mitocondrial foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Tukey com nível de significância $p \leq 0,05$.

Para as variáveis em porcentagem aplicou-se a transformação arco/seno da raiz quadrada para homogeneizar os dados de acordo com HADDAD & VENDRAMIM (2000) e em seguida foi aplicado o teste Kolmogorov-

Smirnov para confirmar a normalidade. Os resultados foram apresentados como médias, desvio padrão e coeficiente de variação.

A associação entre as variáveis respostas foi analisada pela correlação de Pearson e os resultados expressos pelo coeficiente de correlação (r).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 encontram-se os resultados das avaliações dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura* que foi diluído e acrescido de antioxidantes para a congelação. As médias dos valores de motilidade foram acima de 70% e o vigor ≥ 3 , estando de acordo com os valores preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

A avaliação da morfologia espermática é um exame de rotina e pode juntamente com outros testes estimar o potencial de fertilidade (VERSTEGEN, et al., 2002; ZAHALSKY et al., 2003), a média dos defeitos totais do sêmen utilizado foi de 12,2%.

TABELA 1 - Aspectos físicos e morfológicos do sêmen *in natura* dos touros Nelore, utilizados no experimento na Embrapa Cerrados.

Touros	Mot (%)	Vigor (0 a 5)	Volume (ml)	Concentração 10^6 células/ml	Defeitos		
					Maiores (%)	Menores (%)	Totais (%)
1	70	3	7	435	7	6	13
2	70	3,5	9	175	4,9	3,4	8,3
3	77,5	3	6,5	1155	5,7	5,7	11,4
4	72,5	4	8	270	10,9	4,3	15,2
5	77,5	4	5	1035	8,2	2,4	10,6
6	77,5	4	6	245	4,7	9,8	14,5
Média	74,2	3,6	6,9	552,5	6,9	5,3	12,2

Na tabela 2 estão descritas as médias e desvio padrão dos parâmetros da cinética espermática, obtidas pelo sistema de análise computadorizada (CASA), do sêmen bovino criopreservado com os diferentes antioxidantes e as respectivas concentrações. Sabe-se que o aumento nos níveis de ROS tem sido correlacionado com a diminuição da motilidade, no entanto não se sabe o mecanismo pelo qual os ROS causam esta diminuição (AGARWAL, 1994).

Tem sido sugerido que o H_2O_2 difunde-se através das membranas das células e inibe a atividade de algumas enzimas, como a glicose-6-fosfato, e esta controla o fluxo de glicose pela via da hexose monofosfato controlando a

disponibilidade de NADPH, que é usado como fonte de elétrons pelo espermatozóide para a formação de ROS. Outra hipótese envolve uma série de eventos que leva a diminuição da fosforilação de proteínas do axonema e imobilização dos espermatozoides (MAKKER et al., 2009).

Neste trabalho verificou-se que as diferentes concentrações dentro do mesmo antioxidante não influenciaram os resultados de forma significativa para os parâmetros VAP, VSL, ALH, BCF, STR e LIN. Isto indica que os antioxidantes não atuaram na proteção destas características contra os ROS, ou não houve produção significativa de ROS para desafiar as amostras do sêmen e conseqüentemente ter respostas diferentes quanto às distintas concentrações de antioxidantes.

Nos parâmetros motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), as doses do antioxidante α -tocoferol 50 e 150 μ M diferiram, sendo que na dose de 150 μ M foram obtidos valores mais baixos, 43 e 17% respectivamente. Para as doses de 50 e 100 μ M obteve-se respectivamente para MT 76,5 e 53,8% e para a MP 32,8 e 21,7%. Com isto pode se verificar que esta molécula atuou de forma desfavorável, dependendo da concentração utilizada.

De acordo com GUOHUA & RICHARD (1993), o trolox (forma solúvel da vitamina E) pode agir como um estimulador de oxidação, em vez de antioxidante, o mecanismo envolvido pode ser a reação do α -tocoferol com radicais hidroxila, que pode causar a formação de novos radicais prejudiciais e, conseqüentemente, prejudicar a mobilidade dos espermatozoides. No trabalho de HU et al. (2011) foi verificado que a maior dose de vitamina E (2,0 mg/ml) utilizada no meio para sêmen bovino baixou de forma significativa a atividade da glutathione peroxidase e glutathione reductase e estas tem importante papel na neutralização de ROS. Segundo estes mesmos autores, a vitamina E apresentou efeito dose dependente, pois em vez de melhorar a qualidade do sêmen, a suplementação com vitamina E na concentração de 2,0 mg/ml influenciou negativamente os parâmetros da qualidade seminal.

TABELA 2 - Médias e desvio padrão dos parâmetros da cinética espermática: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN), obtidos pelo sistema de análise computadorizada (CASA) do sêmen bovino criopreservado com diferentes antioxidantes e concentrações.

Trat.	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)
Cat 20	76,7 \pm 15,4 ^a	35,3 \pm 15,4 ^a	68,1 \pm 8,7 ^a	50,8 \pm 8,1 ^a	121,3 \pm 14,7 ^a	5,9 \pm 0,6 ^a	26,9 \pm 4,2 ^a	75,8 \pm 5,4 ^a	43,8 \pm 5,6 ^a
Cat 80	70,2 \pm 10,1 ^{ab}	34,7 \pm 13 ^a	67,5 \pm 4,9 ^{ab}	51 \pm 7,1 ^a	118,7 \pm 10,3 ^{ab}	5,8 \pm 1,0 ^a	28,2 \pm 4,7 ^a	77,0 \pm 8,3 ^a	45,5 \pm 7,3 ^a
Cat 200	66,5 \pm 12,8 ^{ab}	32,5 \pm 14,2 ^a	65,1 \pm 5,8 ^{abc}	49,5 \pm 8,6 ^{ab}	115,5 \pm 8,2 ^{ab}	5,9 \pm 0,9 ^a	26,7 \pm 4,5 ^a	76,3 \pm 7,2 ^a	44,7 \pm 6,7 ^a
Trol 50	76,5 \pm 9,7 ^a	32,8 \pm 10,7 ^a	63,8 \pm 7,8 ^{abc}	47,4 \pm 6,5 ^{ab}	112,8 \pm 15,7 ^{ab}	5,9 \pm 1,1 ^a	26,5 \pm 4,5 ^a	76,0 \pm 5,9 ^a	44,8 \pm 5,6 ^a
Trol 100	53,8 \pm 8,6 ^{bc}	21,7 \pm 7,4 ^{ab}	60,2 \pm 5,3 ^{bc}	46,3 \pm 4,9 ^{ab}	108,4 \pm 13,3 ^{ab}	5,7 \pm 0,9 ^a	27,8 \pm 4,9 ^a	77,7 \pm 6,6 ^a	45,2 \pm 6,7 ^a
Trol 150	43 \pm 24,6 ^c	17 \pm 12,1 ^b	57,2 \pm 7,9 ^c	43,4 \pm 6,4 ^b	103,8 \pm 16,2 ^b	6,0 \pm 0,6 ^a	26,8 \pm 3,6 ^a	76,2 \pm 4,8 ^a	43,5 \pm 4,2 ^a
Pir 1,5	67,8 \pm 18,4 ^{ab}	33,8 \pm 19,7 ^a	67,7 \pm 6,7 ^{ab}	50 \pm 8,8 ^{ab}	119,8 \pm 12,1 ^a	5,7 \pm 0,7 ^a	27,4 \pm 5,3 ^a	75,3 \pm 7,3 ^a	44,5 \pm 7,1 ^a
Pir 3,5	59,7 \pm 15,5 ^{abc}	25 \pm 13,0 ^{ab}	66,1 \pm 6,3 ^{ab}	48,6 \pm 8,6 ^{ab}	117,4 \pm 11,3 ^{ab}	5,9 \pm 1,1 ^a	27,3 \pm 4,3 ^a	75 \pm 8,6 ^a	44,2 \pm 8,1 ^a
Pir 5,0	72,5 \pm 12 ^{ab}	32,8 \pm 13,8 ^a	62,8 \pm 7,7 ^{abc}	47,4 \pm 8,5 ^{ab}	111,9 \pm 10,3 ^{ab}	5,9 \pm 0,8 ^a	25,9 \pm 4,8 ^a	76,5 \pm 5,9 ^a	44,3 \pm 6,5 ^a
Cont	61,2 \pm 22,6 ^{abc}	26,2 \pm 19,8 ^{ab}	64,4 \pm 10,0 ^{abc}	46,9 \pm 9,8 ^{ab}	115,8 \pm 17,3 ^{ab}	6,0 \pm 0,9 ^a	26,9 \pm 4,5 ^a	74,7 \pm 7,8 ^a	43,3 \pm 7,4 ^a
CV	15,9	24,8	6,4	7,6	6,8	6,5	6,7	3,2	4,5

Cat 20: Catalase 20 UI; Cat 80: Catalase 80 UI; Cat 200: Catalase 200 UI; Trol 50: α -tocoferol 50 μM ; Trol 100: α -tocoferol 100 μM ; Trol 150: α -tocoferol 150 μM ; Pir 1,5: Piruvato 1,5 μM ; Pir 3,5: Piruvato 3,5 μM ; Pir 5,0: Piruvato 5,0 μM . CV: Coeficiente de variação. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Nos valores de motilidade total não houve diferença estatística entre o grupo controle e as diferentes concentrações dos antioxidantes. Nos tratamentos com catalase e α -tocoferol, observa-se uma diminuição dos valores com o aumento da concentração dos antioxidantes. De acordo com WANG & QUINN (1999), o α -tocoferol interage com outros constituintes da membrana formando complexos que desestabilizam a bicamada, conseqüentemente estas alterações na estrutura da membrana podem provocar diminuição da motilidade.

Nos grupos tratados com piruvato também não foi observada diferença estatística entre as concentrações. Sabe-se que o piruvato é um substrato energético, move-se livremente no citoplasma chega nas mitocôndrias e participa da geração de ATP (BRUEMMERT et al., 2002). SILVA et al. (2008) verificaram em sêmen de eqüino que o grupo tratado com piruvato mostrou maior motilidade total em comparação com os grupos sem antioxidante e o tratado com trolox.

Na motilidade progressiva não houve diferença estatística entre os grupos tratados e o controle. Entretanto, o tratamento de α -tocoferol 150 μ M demonstrou 17% de espermatozoides com movimento progressivo, diferindo estatisticamente dos tratamentos com catalase 20, 80, 200 UI; α -tocoferol 50 μ M; piruvato 1,5 e 5,0 μ M. Dentro do grupo que utilizou α -tocoferol, o aumento da dose promoveu a diminuição da porcentagem de espermatozoides com movimento progressivo. Nas concentrações de 1,5 e 5,0 μ M de piruvato houve um aumento em relação a concentração de 3,5 μ M, porém sem diferença. BRUEMMERT et al. (2002) verificaram que no sêmen de equino in natura diluído com leite desnatado e acrescido das concentrações de 1, 2 ou 5 mM de piruvato de sódio e incubado a temperatura de 25°C durante 24 horas, manteve 45% de espermatozoides com motilidade progressiva, enquanto o grupo sem o piruvato teve 26%, ou seja o antioxidante ajudou a manter a motilidade progressiva, porém as diferentes concentrações não influenciaram.

AURICH et al. (1997) trabalhando com diferentes doses de catalase em sêmen eqüino verificaram que o aumento da dose influencia de forma negativa a motilidade progressiva, comportamento também observado neste experimento, porém sem diferença estatística.

No parâmetro velocidade média da trajetória dos espermatozóides não houve diferença estatística entre os tratamentos e o grupo controle, porém houve diferença entre alguns grupos tratados com antioxidantes. O tratamento com α -tocoferol 150 μ M diferiu estatisticamente dos tratamentos catalase 20 e 80 UI e piruvato 1,5 e 3,5 μ M, assim pode-se verificar mais uma vez o efeito negativo do α -tocoferol na maior concentração. ROCA et al. (2005) trabalhando com concentrações de 200 e 400 UI/ml de catalase no sêmen de suíno não verificaram diferença estatística entre as diferentes doses. Apenas observaram maiores velocidades nos grupos tratados em relação ao controle, o que não foi verificado neste trabalho.

Os valores da velocidade progressiva e da velocidade curvilinear entre os grupos tratados e o controle não diferiram estatisticamente, porém o tratamento com α -tocoferol 150 μ M teve as menores velocidades comparando-se com os demais tratamentos e este teve diferença estatística entre a catalase 20 e 80 UI para a VSL e catalase 20 para a VCL. Os tratamentos com a catalase tiveram maiores velocidades, porém sem diferença estatística entre as doses. Verifica-se que o aumento das doses dos antioxidantes provoca um decréscimo das velocidades. ROSSI et al. (2001) utilizaram catalase na dose de 200 UI/ml em sêmen humano e não verificaram diferença para VSL e VCL entre o grupo tratado e o controle. Assim, constatou-se que o antioxidante não atuou de forma eficiente nestes parâmetros.

Nos parâmetros ALH e BCF não foram observadas diferenças estatísticas entre tratamentos, doses e grupo controle. Também não se verificou um comportamento uniforme dos parâmetros avaliados com o aumento das doses dos antioxidantes. Segundo MATOS et al. (2008) a ALH está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do ovócito, ou seja, está associada com a fecundação. O aumento na frequência do batimento flagelar e no deslocamento lateral da cabeça são algumas das características observadas durante a hiperativação dos espermatozóides (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002). Portanto, neste trabalho não foi verificada a influência dos antioxidantes nestes parâmetros, quando comparados ao controle. Este fato pode ser justificado pelo tipo de antioxidante, concentração, quantidade insuficiente de ROS que induza o estresse oxidativo, uma vez que as amostras não foram desafiadas, podendo estes danos serem oriundos do

processo de criopreservação (congelamento e descongelamento). A extensão dos danos causados pelo estresse oxidativo não depende apenas da natureza e quantidade de ROS, mas também de fatores extracelulares tais como temperatura, tensão de oxigênio e composição do meio (íons, proteínas, antioxidantes) ao qual os espermatozoides são submetidos (MAKKER et al., 2009).

Para a retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) não observou-se diferença estatística significativa entre os grupos estudados, e a interação dos espermatozoides com os antioxidantes ao modificar as doses não se observou uniformidade na resposta. Verifica-se para os parâmetros STR e LIN que o grupo controle obteve a menor porcentagem, sendo de 74,7 e 43,3%, respectivamente. ROCA et al. (2005) trabalhando com 200 e 400 UI/ml de catalase não verificaram diferença estatística para a linearidade.

Na tabela 3 são apresentadas as médias da porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e lesada nos diferentes grupos. Verifica-se que as diferentes concentrações do mesmo antioxidante não alteraram de forma significativa a viabilidade celular.

De acordo com SOBRINHO (2009), se o antioxidante utilizado no tratamento não for responsável pela destruição dos EROS em determinado momento, este tratamento não apresentará resultados desejados. Assim pode-se supor que os antioxidantes não estão atuando na proteção da membrana.

TABELA 3 - Médias e desvio padrão da integridade de membrana plasmática do sêmen bovino criopreservado com diferentes antioxidantes e concentrações

Tratamento	Membrana Plasmática (%)	
	Íntegro	Lesado
Cat 20	39,5±11,8 ^a	60,5±11,8 ^b
Cat 80	36,3±11,3 ^a	63,7±11,3 ^{ab}
Cat 200	37,5±8,4 ^a	62,5±8,4 ^b
Trol 50	30,8±9,3 ^{ab}	69,2±9,3 ^{ab}
Trol 100	29,5±17,6 ^{ab}	70,5±17,6 ^{ab}
Trol 150	22,5±8,8 ^b	77,5±8,8 ^a
Pir 1,5	37,7±12,4 ^a	62,3±12,4 ^b
Pir 3,5	34,5±12,3 ^a	65,5±12,3 ^{ab}
Pir 5,0	33,5±11,8 ^{ab}	66,5±11,8 ^{ab}
Cont	35,5±12,7 ^a	57,5±18,6 ^b
CV (%)	18,1	12,1

Cat 20: Catalase 20 UI; Cat 80: Catalase 80 UI; Cat 200: Catalase 200 UI; Trol 50: α -tocoferol 50 μ M; Trol 100: α -tocoferol 100 μ M; Trol 150: α -tocoferol 150 μ M; Pir 1,5: Piruvato 1,5 μ M; Pir 3,5: Piruvato 3,5 μ M; Pir 5,0: Piruvato 5,0 μ M; Cont: controle. CV: Coeficiente de variação. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos

O tratamento com α -tocoferol 150 μ M diferiu do grupo controle em relação à porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra, sendo de 22,5 e 35,5%, respectivamente. Assim foi observado um efeito negativo desta concentração, as demais concentrações do α -tocoferol não apresentaram diferenças estatísticas com os outros tratamentos.

SOBRINHO (2009) não encontrou diferença estatística significativa em sêmen canino quando utilizou a vitamina E para integridade de membrana e acrossoma. Segundo BRADFORD et al. (2003) o α -tocoferol tem maior ação sobre a atividade enzimática do que sobre a estrutura da membrana. BECONI et al. (1991) confirmam que a vitamina E diminui a peroxidação lipídica espermática através da manutenção dos níveis da superóxido dismutase no plasma seminal. Desta forma, torna-se importante trabalhar com esta vitamina associada a antioxidantes enzimáticos, uma vez que durante o processo de congelação há inativação parcial das enzimas relacionadas a degradação dos radicais livres (BILODEAU et al., 2002).

Não foi verificada diferença entre o grupo controle e as diferentes concentrações de catalase e piruvato. KLINC & RATH (2007) trabalhando com sêmen bovino sexado utilizaram a associação de 1mM de piruvato com 15 UI/ml de catalase, obteve no grupo sem antioxidantes uma porcentagem de $53,5 \pm 8,6$ e no grupo com antioxidante $57,4 \pm 6,9$ de espermatozoides com membranas íntegras após o descongelamento não tendo diferença, porém quando as amostras foram incubadas por 24 horas a 37°C , ou seja, foram desafiadas devido a maior exposição ao oxigênio, o grupo com antioxidante permaneceu com 40,7% de membranas íntegras enquanto o grupo sem antioxidante caiu para 7,4% tendo diferença significativa entre os grupos.

Desta forma, a provável justificativa para os resultados deste trabalho não apresentarem diferença estatística significativa pode estar relacionada ao fato de não ter ocorrido excesso e/ou suficiente produção de radicais livres para promover o efeito protetor dos antioxidantes ou as doses não serem eficazes.

Com relação aos espermatozoides vivos sem reação e com reação acrossomal não verificou diferença estatística do grupo controle com os demais tratamentos. No tratamento com α -tocoferol 150 mM teve-se uma menor porcentagem de espermatozoides vivos sem reação e o com catalase 200UI a maior porcentagem de espermatozoides vivos sem reação (tabela 4).

TABELA 4 - Porcentagem de espermatozoides vivos com acrossomo reagido, vivos sem reação acrossomal, mortos com acrossomo reagido e mortos sem reação acrossomal, das amostras de sêmen pós descongelação nos diferentes tratamentos com antioxidantes.

Tratamentos	Vivo sem reação	Vivo com reação	Morto com reação	Morto sem reação
Cat 20	32,0±14,6 ^{ab}	1,3±1,2 ^a	31,5±12,2 ^a	35,2±10,1 ^a
Cat 80	32,8±13,6 ^{ab}	1,8±1,3 ^a	32,7±12,9 ^a	32,7±6,6 ^a
Cat 200	36,2±11,2 ^a	1,5±1,5 ^a	31,2±8,8 ^a	30,5±5,4 ^a
Trol 50	28,8±12,2 ^{ab}	0,5±1,2 ^a	32,5±7,7 ^a	38,2±7,2 ^a
Trol 100	29,3±16,8 ^{ab}	3,2±3,3 ^a	37,5±17,6 ^a	30,0±11,6 ^a
Trol 150	23,2±10,3 ^b	1,7±2,0 ^a	35,0±16,9 ^a	40,2±11,2 ^a
Pir 1,5	35,7±12,4 ^a	0,3±0,8 ^a	31,5±5,2 ^a	32,5±11,1 ^a
Pir 3,5	31,2±11,7 ^{ab}	2,3±2,3 ^a	26,8±9,9 ^a	39,7±8,0 ^a
Pir 5,0	30,7±9,5 ^{ab}	0,0±0,0 ^a	29,8±7,3 ^a	39,3±10,2 ^a
Cont	35,3±14,4 ^{ab}	0,8±1,2 ^a	31,2±10,9 ^a	32,7±8,4 ^a
CV (%)	21	121,8	29,4	19,4

Cat 20: Catalase 20 UI; Cat 80: Catalase 80 UI; Cat 200: Catalase 200 UI; Trol 50: α -tocoferol 50 μ M; Trol 100: α -tocoferol 100 μ M; Trol 150: α -tocoferol 150 μ M; Pir 1,5: Piruvato 1,5 μ M; Pir 3,5: Piruvato 3,5 μ M; Pir 5,0: Piruvato 5,0 μ M; Cont: controle. CV: Coeficiente de variação. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

No trabalho de ROCA et al., (2005) foram utilizadas 200 e 400 UI/ ml de catalase no sêmen de suínos, obtendo-se respectivamente 66,96% e 68,85% de espermatozoides viáveis com acrossoma íntegro pós-descongelação, sem diferença estatística entre eles. De acordo com os mesmos autores, a adição de catalase no diluidor para a preservação do sêmen de mamíferos tem apresentado resultados variados. Esta variação pode ser explicada devido o uso de diferentes protocolos de criopreservação, formulações diferentes de diluentes e variação entre as espécies. PAUDEL et al. (2010) utilizando catalase na concentração de 200UI/ml para sêmen sexado de bovino obteve 31,5% de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro e 24,4% vivos com acrossoma reagido pós-descongelação

Com relação ao α -tocoferol PEIXOTO et al. (2008) utilizaram 60 μ M/L deste antioxidante no sêmen de ovino e obtiveram 53,8 % de espermatozoides com acrossoma íntegro e 70,2%, no grupo controle, verificando uma queda na porcentagem ao utilizar o antioxidante. Este comportamento também foi

verificado neste trabalho. Estes resultados contradizem SILVA et al. (2008) que afirmaram que a vitamina E é o principal antioxidante de membrana tendo uma maior atuação na proteção.

A exposição do sêmen a condições que produzam maior quantidade de radicais livres proporciona uma maior resposta dos antioxidantes acrescentados no meio. De acordo com KLINC & RATH, (2007), os grupos com e sem antioxidante diferiram estatisticamente apenas quando o sêmen foi incubado por 24 horas a 37°C, constatando-se assim o efeito protetor do antioxidante.

Pode-se verificar na literatura diversos trabalhos utilizando antioxidantes, porém como existem diferenças de respostas entre as espécies e os meios de diluição, concentrações de antioxidantes, metodologias de preparo, tempo de estabilização do antioxidante no meio, torna-se difícil a comparação dos resultados entre os diferentes grupos de pesquisa. Sendo assim, torna-se necessária a padronização das metodologias para uma eficiente comparação de resultados com vistas a obtenção de avanços técnicos e científicos nas pesquisas.

Com relação a atividade mitocondrial, os resultados são mostrados na tabela 5. Verifica-se que a maioria dos antioxidantes e concentrações não influenciaram de forma significativa a manutenção da alta atividade mitocondrial (DABI) quando comparada ao grupo controle. Apenas no grupo α tocoferol 100 μ M houve diferença estatística com o controle, no qual o antioxidante interferiu de forma negativa. Os grupos tratados com piruvato tiveram uma maior porcentagem de espermatozóides com ausência de atividade mitocondrial (DABIV). Já os tratamentos com catalase 80 e α tocoferol 150 tiveram uma menor porcentagem de espermatozóides com total ausência de atividade mitocondrial, o que sugere uma maior proteção. Segundo MAKKER et al. (2009) os ROS causam danos na membrana mitocondrial e estes danos causam aumento na produção de ROS, e por esta razão, torna-se importante a utilização de antioxidantes que consigam atuar neste compartimento.

TABELA 5 - Efeito dos tratamentos antioxidantes sobre a porcentagem (média \pm desvio padrão) de espermatozóides classes I,II,III,IV na avaliação da atividade mitocondrial das amostras do sêmen bovino criopreservado.

Trat.	DABI	DABII	DABIII	DABIV
Cat 20	69,71 \pm 10,74 ^{ab}	19,68 \pm 5,12 ^{ab}	4,06 \pm 2,97 ^a	6,55 \pm 4,86 ^a
Cat 80	69,42 \pm 7,22 ^{ab}	21,50 \pm 5,49 ^{ab}	4,58 \pm 1,69 ^a	4,5 \pm 4,06 ^a
Cat 200	71,17 \pm 7,89 ^{ab}	20 \pm 6,31 ^{ab}	3,08 \pm 1,16 ^a	5,75 \pm 4,36 ^a
Trol 50	67,33 \pm 11,32 ^{ab}	20,25 \pm 6,74 ^{ab}	5,67 \pm 2,62 ^a	6,75 \pm 9,36 ^a
Trol 100	63,42 \pm 13,51 ^b	22,89 \pm 6,54 ^a	6,72 \pm 4,19 ^a	6,97 \pm 6,62 ^a
Trol 150	67,44 \pm 14,70 ^{ab}	21,60 \pm 9,30 ^{ab}	5,98 \pm 2,52 ^a	4,99 \pm 6,23 ^a
Pir 1,5	71,02 \pm 7,98 ^{ab}	16,40 \pm 3,92 ^{ab}	4,66 \pm 1,97 ^a	7,91 \pm 9,67 ^a
Pir 3,5	69,44 \pm 8,40 ^{ab}	18,23 \pm 5,64 ^{ab}	2,91 \pm 0,58 ^a	9,41 \pm 12,10 ^a
Pir 5,0	71,08 \pm 10,50 ^{ab}	15,98 \pm 6,73 ^{ab}	3,91 \pm 1,64 ^a	9,04 \pm 10,58 ^a
Cont	78,80 \pm 9,34 ^a	11,99 \pm 4,11 ^b	3,74 \pm 1,61 ^a	5,47 \pm 7,41 ^a
CV	9,95	29,55	45,51	62,86

Cat 20: Catalase 20 UI; Cat 80: Catalase 80 UI; Cat 200: Catalase 200 UI; Trol 50: α -tocoferol 50 μ M; Trol 100: α -tocoferol 100 μ M; Trol 150: α -tocoferol 150 μ M; Pir 1,5: Piruvato 1,5 μ M; Pir 3,5: Piruvato 3,5 μ M; Pir 5,0: Piruvato 5,0 μ M; Cont: controle. CV: Coeficiente de variação. Letras diferentes, na mesma coluna, indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Para avaliação dos níveis de proteção antioxidante e de peroxidação lipídica nos espermatozóides utilizou-se a geração artificial de ROS com a mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Observa-se na tabela 6 que não houve diferença estatística nas respostas a resistência dos espermatozóides a peroxidação lipídica dos diferentes tratamentos com o grupo controle. Apenas entre a catalase 20 UI e o α -tocoferol 150 μ M houve diferença estatística, demonstrado que o tratamento com α -tocoferol teve uma menor peroxidação lipídica. Apesar de não ter havido diferença estatística significativa entre as concentrações dentro de cada antioxidante, verificou um aumento na peroxidação quando se tem menor concentração dos antioxidantes. ROCA et al. (2005) não verificaram diferença estatística para o TBARS ao comparar o grupo controle e as concentrações de 200 e 400 UI/ml de catalase em sêmen de suíno descongelado. Já PAUDEL et al. (2010) verificaram diferença no nível de TBARS no sêmen de touro com

catalase na dose 200UI/ml e o grupo controle, porém este sêmen além de passar pelo processo de criopreservação foi sexado, apresentando assim uma maior manipulação, exigindo do antioxidante uma maior atuação na proteção dos espermatozoides.

TABELA 6 - Efeito dos tratamentos antioxidantes sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ng/milhão de células espermáticas) das amostras do sêmen bovino criopreservado.

	Cat20	Cat 80	Cat200	Trol 50	Trol100	Trol150	Pir 1,5	Pir 3,5	Pir 5,0	Cont
TBARS	150,5 ^a	149,1 ^{ab}	140,7 ^{ab}	136,2 ^{ab}	121,2 ^{ab}	109,5 ^b	144,8 ^{ab}	128,2 ^{ab}	131,1 ^{ab}	148,6 ^{ab}
Desv.P	76,86	85,46	89,93	81,98	79,03	73,76	98,62	77,23	86,56	97,15

Cat 20: Catalase 20 UI; Cat 80: Catalase 80 UI; Cat 200: Catalase 200 UI; Trol 50: α -tocoferol 50 μ M; Trol 100: α -tocoferol 100 μ M; Trol 150: α -tocoferol 150 μ M; Pir 1,5: Piruvato 1,5 μ M; Pir 3,5: Piruvato 3,5 μ M; Pir 5,0: Piruvato 5,0 μ M; Cont: controle. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos; Desv.P: desvio padrão; CV(coeficiente de variação): 15,64%

Na tabela 7 encontram-se as correlações entre as variáveis, sendo algumas delas complementares ou calculadas a partir de outras, portanto não serão utilizadas na discussão. Verifica-se que as células classificadas com alta atividade mitocondrial tiveram correlação negativa com a motilidade total, motilidade progressiva, VSL, BCF, STR e LIN e positiva para ALH. Isto indica que se há maior número de células com alta atividade mitocondrial pode haver maior produção de ROS e estes interferem nos índices de motilidade. As mitocôndrias são responsáveis pela maior parte da produção endógena de ROS e quando se tem um desequilíbrio entre produção e o sistema antioxidante gera-se o estresse oxidativo que provoca danos nas células e imobilização (COPELAND, 2002; PERIS et al., 2007).

A ausência de atividade mitocondrial foi correlacionada negativamente com TBARS, ou seja quanto maior a porcentagem de células sem atividade mitocondrial, menor foi o valor de TBARS e conseqüentemente menor produção de ROS e menor peroxidação lipídica.

As células com membranas íntegras tiveram correlação negativa com os espermatozoides mortos com e sem reação acrossomal e TBARS, porém positiva com células vivas sem reação acrossomal e motilidade total. Desta forma, quando houve uma maior porcentagem de células íntegras, estas apresentaram-se móveis e sem reação acrossomal, ou seja, com características desejáveis para amostras criopreservadas. A existência da

correlação negativa entre integridade de membrana e TBARS justifica-se pelo fato de que quando se tem maior índice de TBARS, obtém maior peroxidação e, conseqüentemente, maior lesão de membranas, podendo ser um indicativo da não atuação adequada dos antioxidantes.

A análise dos parâmetros desta correlação deve ser avaliada com cautela uma vez que para fazer esta correlação utilizou-se dados de todos os tratamentos e quando se trata do parâmetro TBARS, deve-se lembrar que a peroxidação medida por ele foi induzida, ou seja, não foi ocasionada por estresse oxidativo durante o processo de criopreservação, congelamento e descongelamento das amostras.

TABELA 7 - Coeficientes de correlação entre as variáveis resposta da integridade de membrana das células íntegras (INT), e lesada (LES); reação acrossomal, com reação (CR) e sem reação (SR); concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) , células classe I, II, III, IV da atividade mitocondrial (DABI, DABII, DABIII, DABIV) das amostras do sêmen bovino criopreservado.

	Integro	Lesado	Vivo sem reação	Vivo com reação	Morto sem reação	Morto com reação	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	MT	MP	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	MDA
Integro	1,00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Lesado	-0,94**	1,00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Vivo sem reação	0,89**	-0,82**	1,00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Vivo com reação	0,21	-0,16	0,18	1,00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Morto sem reação	-0,59**	0,54**	-0,73**	-0,03	1,00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Morto com reação	-0,53**	0,50**	-0,51**	-0,39	-0,20	1,00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DAB I	-0,08	-0,01	-0,15	0,06	0,14	0,03	1,00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DAB II	-0,14	0,18	-0,16	0,05	0,09	0,09	-0,52**	1,00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DAB III	-0,08	0,13	0,04	-0,08	-0,01	-0,02	-0,75**	0,31*	1,00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DAB IV	0,26*	-0,19	0,33*	-0,10	-0,27*	-0,11	-0,68**	-0,25	0,44*	1,00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MT	0,25	-0,21	0,23	-0,33*	-0,29*	0,10	-0,37*	0,12	0,13	0,36*	1,00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MP	0,18	-0,16	0,15	-0,21	-0,22	0,10	-0,35*	0,13	0,10	0,34*	0,79**	1,00	---	---	---	---	---	---	---	---
VAP	0,15	-0,23	0,00	0,00	-0,22	0,26*	0,00	0,24	-0,19	-0,15	0,45*	0,56**	1,00	---	---	---	---	---	---	---
VSL	0,09	-0,15	0,03	-0,08	-0,19	0,22	-0,29*	0,20	0,06	0,21	0,54**	0,87**	0,76**	1,00	---	---	---	---	---	---
VCL	0,06	-0,16	-0,08	0,10	-0,13	0,25	0,24	0,18	-0,32*	-0,38*	0,23	0,17	0,87**	0,40*	1,00	---	---	---	---	---
ALH	-0,15	0,13	-0,20	0,15	0,17	0,04	0,48*	-0,11	-0,27*	-0,47*	-0,36*	-0,69**	-0,14	-0,64**	0,29*	1,00	---	---	---	---
BCF	0,05	-0,05	0,13	-0,14	-0,23	0,14	-0,49**	0,07	0,35*	0,50**	0,46*	0,74**	0,24	0,72**	-0,14	-0,79**	1,00	---	---	---
STR	0,00	0,01	0,06	-0,15	-0,10	0,07	-0,49**	0,04	0,33	0,53**	0,38*	0,73**	0,09	0,71**	-0,32*	-0,85**	0,88**	1,00	---	---
LIN	0,05	-0,05	0,09	-0,17	-0,13	0,08	-0,49**	0,08	0,29*	0,51**	0,41*	0,79**	0,20	0,77**	-0,26*	-0,90**	0,88**	0,97**	1,00	---
MDA	-0,25	0,18	-0,34*	-0,08	0,08	0,37*	0,18	0,23	-0,14	-0,39*	0,08	-0,10	0,53**	0,08	0,73**	0,40*	-0,26*	-0,40*	-0,37*	1,00

**com diferença estatística com $p \leq 0,0001$; * $p \leq 0,05$

6. CONCLUSÃO

Os parâmetros avaliados tiveram respostas variadas em relação aos antioxidantes e as diferentes concentrações. As menores concentrações dos antioxidantes foram aparentemente mais eficientes comparando com o grupo controle para as motilidade, velocidade de trajetória e integridade de membrana. O α -tocoferol na concentração de 150 μ M apresentou resultados negativos em diversos parâmetros, sugerindo um efeito tóxico. Em relação a peroxidação lipídica, as maiores concentrações dos antioxidantes os espermatozóides tiveram menor peroxidação lipídica.

Novas abordagens com as mesmas moléculas tornam-se necessárias para identificar a concentração ideal que possa beneficiar todos os parâmetros espermáticos pós-descongelação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LOUGHLIN, K. R. Relationship of sperm parameters to levels of reactive oxygen species in semen specimens. **Journal of Urology**, Baltimore, v. 152, p. 107-110, 1994.
2. AGARWAL, A.; SAID, T.M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU International**, Oxford, v. 4, p. 503-507, 2005.
3. AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; CARRERAS, A.; IRVINE, D. S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 21, n. 4, p. 495-504, 1996.
4. AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 7, p. 145-173, 1987.
5. ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W. J.; SIKKA, S. C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 7/8, p. 869-880, 1999.
6. AURICH, J. E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, p. 185-192, 1997.
7. BALDASSARRE, H. Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación a clonación. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, p. 274-282, 2007.

8. BALL, B. A.; VO, A.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, p. 508-515, 2001.
9. BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (Leopardus tigrinus, Schreber, 1775)**. 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007).
10. BAVISTER, B. D.; EDWARDS, R. G.; STEPTOE, P. C. Identification of the midpiece and tail of the spermatozoon during fertilization of human eggs in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 20, p. 159-160, 1969.
11. BECCAGLIA, M.; ANASTASI, P.; CHIGIONI, S.; LUVONI, G. C. Tris-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine sêmen. **Reproduction in Domestic Animals**. (Suppl.2), Berlin, v. 44, p. 345-349, 2009.
12. BECONI, M. T.; AFFRANCHINO, M. A.; SCHANG, L. M.; BEORLEGUI, N. B. Influence of antioxidant on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, Marrickville, v. 23, n. 3, p. 545-553, 1991.
13. BECONI, M. T.; FRANCIA, C. R.; MORA, N. G.; AFFRANCHIO, M. A. Effect of natural antioxidant on frozen bovine sêmen preservation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 40, p. 841-851, 1993.
14. BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRARD, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p.1105-1122, 2002.
15. BJORNEBOE, A.; BJORNEBOE, G. E. A.; DREVON, C. A. Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E, **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 120, p. 233-242, 1990.

16. BOLLE, P.; EVANDRI, M. G.; SASO, L. The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. **Contraception**, Stoneham, v. 62, n. 4, p. 313-315, 2002.
17. BORGES, J. C. **Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro***. 2008. 70f. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
18. BRADFORD, A.; ATKINSON, J.; FULLER, N.; RAND, R. O. The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 44, n. 10, p. 1940-1945, 2003.
19. BRAMLEY, P.M.; ELMADFA, I.; KAFATOS, A.; KELLY, F.J.; MANIOS, Y.; ROXBOROUGH, H.E.; SCHUCH, W.; SHEEHY, P.J.A.; WAGNER, K-H. Review vitamin E. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, West Sussex, v.80, n.7, p.913-938, May 2000.
20. BROUWERS, J. F. H. M.; GADELLA, B. M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 35, p. 1382-1391, 2003.
21. BRUEMMERT, J. E.; COY, R. C.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 12-18, 2002.
22. BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p.302-310, 1978.
23. BUETTNER, G. R. The pecking order of free radical and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.
24. CALAMERA, J. C.; FERNANDEZ, P. J.; BUFFONE, M. G.; ACOSTA, A. A.; DONCEL, G. F. Effect of long-term *in vitro* incubation of human

- spermatozoa: functional parameters and catalase effect. **Andrologia**, Berlin, v. 33, n. 2, p. 79-86, 2001.
25. CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J. F.; SILVEIRA, N. A.; FRENEAU, G. E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho; **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, 2002.
26. CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte, 1998. 49p.
27. CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 59, p. 451-458, 2001.
28. CHOW, C. K. Vitamin E in plasma, erythrocytes and erythrocytes membranes. **Progress in clinical and biological research**, v 292, p. 445-451, 1989.
29. COPELAND, W. C. Mitochondrial DNA: methods and protocols. In: **Methods in Molecular Biology**, Humana Press, Totowa, 420p, 2002.
30. DANDEKAR, S. P.; NADKARNI, G. D.; KULKARNI, V. S.; PUNEKAR, S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 48, n. 3, p. 186-190, 2002.
31. DE LAMIRANDE, E.; TSAI, C.; HARAKAT, A.; GAGNON, C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 19, p. 585–594, 1998.
32. DE LAMIRANTE, E. & GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 13, n. 5, p. 368-378, 1992.

- 33.ERNSTER, L.; FOSMARK, P.; NORDENBRAND, K. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes. Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles, **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, p. 548-551, 1992
- 34.FABBROCINI, A.; DEL SORBO, C.; FASANO, G.; SANSONE, G. Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of mediterranean buffalo (*h.bubalis*) spermatozoa, **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, p. 193-207, 2000.
- 35.FARISS, M. W. Cadmium toxicity: Unique cytoprotective properties of alpha tocopheryl succinate in hepatocytes, **Toxicology**, Limerick, v. 69, p. 63-77, 1991.
- 36.FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A. E.; ESTESO, M. C.; GARDE, J. J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. **International Journal of Andrology**, Blackwell, v. 32, p.353-359, 2008.
- 37.FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.43, n.1, p.1-16, 1997.
- 38.GADEA, J.; SELLES, E.; MARCO M. A.; COY, P.; MATAS, C.; ROMAR, R.; RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, Stoneham, v.62, p.690-701, 2004.
- 39.GARRIDO, N.; MESEGUER, M.; SIMON, C.; PELLICER, A.; REMOHI, J. Pro-oxidative ant anti-oxidant imbalance in human sêmen ant its relation with male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, p. 59-65, 2004.
- 40.GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector actions in biological systems. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 39, n. 8, p. 1529-1542, 1998.

41. GUOHUA CAO & RICHARD G. CUTLER, High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, Amsterdam, v.17, p. 189–201, 1993.
42. HADDAD, M. L.; VENDRAMIM, J. D. Comparação de Porcentagens Observadas com Casos Extremos de 0 e 100%. **Anais Sociedade Entomológica**, v. 29, n. 4, p. 835-837, 2000.
43. HALLIWELL, B e GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed., Oxford, 1999. 936p.
44. HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 91, p. 14-22, 1991.
45. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford, 543 p, 1989.
46. HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal Andrology**, Philadelphia, v. 11, p. 73-88, 1990.
47. HARRISON, R. A. P. & VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction. Fertility.**, Nova York, v. 88, p. 343-352, 1990.
48. HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animals Reproduction Science**, Amsterdam, v.62, p. 3-22, 2000.
49. HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamic of changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p.809-828, 1987.
50. HU, J. H.; TIAN, W. Q.; ZHAO, X. L.; ZAN, L. S.; XIN, Y. P.; LI, Q. W. The Cryoprotective Effects of Vitamin B12 Supplementation on Bovine Semen Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 46, n. 66-73, 2011.

51. HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; MCKELVEY-MARTIN, V.J.; THOMPSON, W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, p.1240-1247, 1998.
52. KLINC, P & RATH, D. Reduction of Oxidative Stress in Bovine Spermatozoa During Flow Cytometric Sorting. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, p.63–67, 2007.
53. LONG, L. H.; HALLIWELL, B. Artefacts in cell culture: Pyruvate as a scavenger of hydrogen peroxide generated by ascorbate or epigallocatechin gallate in cell culture media. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.388 p. 700–704, 2009.
54. MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox e catalase**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de Estado de São Paulo, Botucatu, 2006.
55. MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, RAKESH. Oxidative stress & male infertility, **Indian Journal Medical Research**, New Delhi, v.129, p.357-367, 2009.
56. MALLET, R. T.; JIE SUN.; MARTY KNOTT, E.; SHARMA, A. B.; OLIVENCIA-YURVATI, A. H. Metabolic Cardioprotection by Pyruvate: Recent Progress. **Experimental Biology and medicine**, Maywood, v. 230, n. 7, p. 435-443, 2005.
57. MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.67, p.1250-1258, 2002.
58. MARTINS, C. F.; BÁO, S. N.; DODE, M. N.; CORREA, G. A.; RUMPF, R. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and

- fertilizing ability of bovine sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v 67, p.1307-15, 2007.
59. MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. Nutrição – os substratos para as vias metabólicas. In: _____. **Bioquímica Básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap.18. p.241-255.
60. MATÉS, J. M. Effect of antioxidant enzymes in molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, Limerick, v 153, p. 83-104, 2000.
61. MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMENEZ, F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, n. 4, p. 339-345, 1999.
62. MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 225-232, 2008.
63. MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.1013-1020, 1996.
64. MAZZILLI, F.; ROSSI, T.; SABATINI, L.; PULCINELLI, F. M.; RAPONE, S.; DONDERO, F.; GAZZANIGA, P. P. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. **Acta of European Fertility**, v. 26, n. 4, p. 145-8, 1995.
65. MAZZIO, E.; SOLIMAN, K. F. Pyruvic acid cytoprotection against 1-methyl-4-phenylpyridinium, 6-hydroxydopamine and hydrogen peroxide toxicities in vitro. **Neuroscience Letters**, Limerick, v.337, p.77-80, 2003.
66. MCDOWELL, L. R. **Vitamins in animal and human nutrition**. Iowa University Press, p. 793, 2000.

67. MELZER, E.; SCHMIDT, H. L. Carbon isotope effects on the decarboxylation of carboxylic acid. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 252, p. 913-915, 1988.
68. MEYER, T. N.; GLOY, J.; HUG, M. J.; GREGER, R.; SCHOLLMEYER, P.; PAVENSTADT, H. Hydrogen peroxide increases the intracellular calcium activity in rat mesangial cells in primary culture. **Kidney International**, Malden, v.49, p. 388–395, 1996.
69. MICHAEL, A. J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; SARATSI, Ph.; VERVERIDIS, H. N.; BOSCO, C. M. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, p. 204-212, 2007.
70. MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.3, p.403–439, 1997.
71. NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical in Biology & Medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
72. O'DONNELL-TORMEY, J.; NATHAN, C.F.; LANKS, K.; DEBOER, C. J., HARPE, J. Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. **Journal Experimental Medicine**, New York, v. 165, p. 500–514, 1987.
73. O'FLAHERTY, C.M., BEORLEGUI, N.B., BECONI, M.T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrossome reation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 289-301, 1999.
74. OCHSENDORF, F. R. Infections in the male genital tract and reative oxygen species. **Human Reproduction**, Oxford, v. 5, p. 399-420, 1999.

75. OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 95, p.351-358, 1979.
76. PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R.; THOMAS, A. J.; AGARWAL, A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 459-464, 2000.
77. PAUDEL, K.P.; KUMAR, S.; MEUR, S. K.; KUMARESAN, A. Ascorbic acid, Catalase and Chlorpromazine reduce cryopreservation-induced damages to crossbred bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals, Berlin**, v. 45, p. 256-262, 2010.
78. PEIXOTO, A. L. V. A.; MONTEIRO Jr, P. L. J.; CÂMARA, D. R.; VALENÇA, R. M. B.; SILVA, K. M. G.; GUERRA, M. M. P. Efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com tris-gema suplementado com vitamina c e trolox. **Ciências Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 11, n. 1, p. 16 – 24, 2008.
79. PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, p. 85-98, 2003.
80. PERIS, I. S.; BILODEAU, J. F.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. L. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 74, p. 874-892, 2007.
81. RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 22, n. 2, p. 278-284, 2001.

82. ROCA, J.; RODRIGUEZ, M. J.; GIL, M. A.; CARVAJAL, G.; GARCIA, E. M.; CUELLO, C.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. Survival and In Vitro Fertility of Boar Spermatozoa Frozen in the Presence of Superoxide Dismutase and/or Catalase. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 26, n.1, p. 15-24, 2005.
83. ROSSI, T.; MAZZILLI, F. DELFINO, M.; DONDERO, F. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. **Cell Tissue Bank**, v. 2, p. 9-13, 2001.
84. RUTZ, F.; ANCIUTI, M. A.; XAVIER, E. G.; ROLL, V. F. B.; ROSSI, P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 307-317, 2007.
85. SALAHUDEEN, A. K.; CLARK, E. C.; NATH, K. A. Hydrogen peroxide-induced renal injury. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 88, p. 1886-1893, 1991.
86. SARIOZKAN, S.; TUNCER, P. B.; BUCAK, M. N.; ULUTAS, P. A. Influence of Various Antioxidants on Microscopic-Oxidative Stress Indicators and Fertilizing Ability of Frozen-Thawed Bull Semen. **Acta Veterinaria Brno**. República Tcheca, v. 78, p.463-469, 2009.
87. SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. A role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, Ohio, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.
88. SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal Andrology**., Philadelphia, v. 25, p. 5-18, 2004.
89. SILUK, D.; OLIVEIRA, R.V.; ESTHER-RODRIGUEZ-ROSAS, M.; LING, S.; BOS, A.; FERRUCCI, L.; WAINER, I.W. A validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.44, n.4, p.1001-1007, Aug 2007.

90. SILVA, C.R.M; NAVES, M.M.V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n.2, p.135-143, mai/ago 2001.
91. SILVA, K. M. G.; GAMBOA, S. C.; RODRIGUES, A. S.; SANTOS, J. R.; GUERRA, M. M. P. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelação de sêmen de garanhões férteis e subférteis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n. 8, p. 2271-2277, 2008.
92. SOBRINHO, C. A. B.; **Efeito do tratamento com antioxidants na qualidade de espermatozóides criopreservado de cães**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
93. SWENSON, M. J.; REENCE, W. O.; DUKES **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11ª edição, Editora Guanabara Koogan. S.A. Rio de Janeiro, 1996, 856p.
94. THIANGTUM, K.; PINYOPUMMIN, A.; HORI, T.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Effect of catalase and superoxide dismutase on motility, viability and acrossomal integrity of frozen-thawed cat spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**. (Suppl.2), Berlin, p. 369-372, 2009.
95. THOMSON, L. K.; FLEMING, S. D.; AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; ZIESCHANG, J. A.; CLARK, A. M. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, Oxford, v. 24, n. 9, p. 2061-2071, 2009.
96. TRABER, M.G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.43, n.1, p.4-15, Jul 2007.
97. TRINCHEIRO, G. D.; AFFRANCHINO, M. A.; SHANG, L. M. et al. Antioxidant effect of bovine spermatozoa on lipid peroxidation, **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 8, p. 339-350, 1990.

98. UPRETI, G. C.; JENSEN, K. et al Studies On aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of piruvato as an antioxidant. **Animal Reproduction Science** Amsterdam, v. 51, p. 275-287, 1998.
99. VARMA, S.D., DEVAMANOCHARAN, P.S., MORRIS, S.M. Photoinduction of cataracts in rat lens in vitro: preventive effect of pyruvate. **Experimental Eye Research**, London, v.50, p.805–812, 1990.
100. VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and celular Endocrinology**, Amsterdam, v. 216, p. 31-39, 2004.
101. VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 149-179, 2002.
102. WANG, A. W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I.; ANDERSON, D. J.; LOUGHLIN, K. R. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, Ohio, v. 49, n. 6, p. 921-925, 1997.
103. WANG, X.; QUINN, P. J. Vitamin E and its function in membranes. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 38, p. 309-336, 1999.
104. ZAHALSKY, M. P.; ZOLTAN, E.; MEDLEY, N.; NAGLER, H. M. Morphology and the sperm penetration assay. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 79, n. 1, 2003.
105. ZRIBI, N.; CHAKROUN, N. F.; EL EUCH, H.; GARGOURI, J.; BAHLOUL, A.; KESKES, L. A. Effects of cryopreservation on human sperm deosyribonucleic acid integrity, **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 93, p.159-166, 2010.

ANEXOS**Anexo 1**Meio TRIS

Triladyl10ml
H₂O milli Q.....30ml
Gema de ovo.....10ml

Triladyl (Minitub)^R

Solução TRIS

Ácido cítrico

Açúcar

Glicerina

Água puríssima

Antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina)

Anexo 2

SETUP-HAMILTON THORNE BIOSCIENCES (IVOS- ULTIMATE 12)

Características	Ajuste
Número de imagens adquiridas por campo	30
Taxa de aquisição das imagens	60 HZ
Contraste mínimo das células	80
Tamanho mínimo de células	5 pix
Velocidade de trajeto (VAP)	50 $\mu\text{m/s}$
Retilinearidade (STR)	75%
Valor de corte VSL para células lentas	10 $\mu\text{m/s}$
Seleção de campo	Manual

Anexo 3

Solução para avaliação de integridade de membrana plasmática

Solução I – Solução estoque de IP (0,75 mM)

IP10 mg

Solução salina.....20 ml

Solução II – Solução estoque de C-FDA

C-FDA.....9,2 mg

DMSO.....20 ml

Solução III - Solução estoque de formaldeído

Formaldeído 40%.....4 ml

Solução Salina 0,9%.....96 ml

Solução IV – Solução de citrato de sódio 3%

Citrato de sódio.....3 g

Solução Salina 0,9%.....100 ml

Solução trabalho

Solução I2%

Solução II.....1%

Solução III.....1%

Solução IV.....96%

Anexo 4

Solução para avaliação da integridade acrossomal

Solução I – Solução estoque de IP (0,75 mM)

IP10 mg

Solução salina.....20 ml

Solução II – Solução estoque de PNA

PNA.....1 mg

Tampão fosfato (PBS).....1 ml

Solução III - Solução estoque de formaldeído

Formaldeido 40%.....4 ml

Solução Salina 0,9%.....96 ml

Solução IV – Solução de citrato de sódio 3%

Citrato de sódio.....3 g

Solução Salina 0,9%.....100 ml

Solução trabalho

Solução I2%

Solução II.....1%

Solução III.....1%

Solução IV.....96%