UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PREVENÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO
PELA UTILIZAÇÃO DE TROLOX[®],
CATALASE E GLUTATIONA NO PROCESSO
DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

LEANDRO RODELLO

BOTUCATU – SP

Abril – 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PREVENÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO
PELA UTILIZAÇÃO DE TROLOX[®],
CATALASE E GLUTATIONA NO PROCESSO
DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

LEANDRO RODELLO

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária,
área de Reprodução Animal, para a
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

BOTUCATU – SP

Abril - 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Rodello, Leandro.

Prevenção do estresse oxidativo pela utilização de Trolox[®], Catalase e Glutathione no processo de congelamento de sêmen ovino / Leandro Rodello. – Botucatu, 2010.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Sony Dimas Bicudo

Assunto CAPES: 50504002

1. Antioxidante. 2. Citometria de fluxo. 3. Catalase. 4. Glutathione.

Palavras-chave: Antioxidante; Catalase; Trolox[®]; Citometria de fluxo; Criopreservação; Estresse oxidativo; Gema de ovo; Glutathione; Lipoperoxidação.

Nome do autor: **Leandro Rodello**

Título: **PREVENÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PELA UTILIZAÇÃO DE TROLOX®, CATALASE E GLUTATIONA NO PROCESSO DE CONGELAÇÃO DE SÊMEN OVINO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Câmpus de Botucatu

Prof. Ass. Dr. Paulo Henrique Franceschini
Membro
Departamento Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal
FCAV – UNESP – Câmpus de Jaboticabal

Dr^a. Marciane da Silva Maia
Membro
Setor de Produção Animal
EMBRAPA / EMPARN- Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte

Prof^a. Adj. Dr^a. Maria Denise Lopes
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Câmpus de Botucatu

Prof. Adj. Dr. Cezinando de Meira
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Câmpus de Botucatu

Data da defesa: 20 de abril de 2010

Esta tese é dedicada ...

A DEUS.

A vocês, queridos pais e querida Dindinha, que por amor dedicaram da vida os melhores momentos, para tornarem possível mais este passo de minha vida.

E como foram importantes suas palavras de estímulo, frente por vezes, ao nosso desânimo pelo esforço diário!

As suas preocupações com o nosso cansaço, a nossa alegria se refletiam em sua face que estampava um sorriso maravilhoso.

Vocês foram à força que me impulsionou, fazendo acreditar que a realização do sonho era possível. A vocês pertence boa parte dessa vitória. Minha eterna gratidão.

A você, Priscilla, minha adorada esposa que sabe minha maneira única de te amar. A tua presença, tua companhia, teu sorriso, e as tuas palavras, foram expressão de profundo amor.

Muito obrigado a você que encheu de ternura meu coração, fizeste-me entender que o amor é irmão gêmeo da dor, pois o teu estímulo e carinho foram às armas desta vitória. A você minha amada... Eu te amo!!!!

Aos meus irmãos Beto e Neliane, que compartilharam das alegrias e dificuldades e sempre incentivando o desenvolvimento desta dissertação. Meu muito obrigado amo vocês.

Aos meus avôs Roque (*in memorian*), Margarida (*in memorian*) e Alba (*in memorian*), apesar de não estarem mais entre nós, eu sei que estão sempre me guiando e me protegendo.

À minha sogra Olga e meu sogro Gerson, pelo carinho, incentivo e apoio na realização deste experimento.

Ao meu querido filho João Vitor que chegou para encher meu coração de alegria. Eu te amo. Enzo (*in memorian*) do meu coração, apesar o seu curto tempo entre nós, aprendi amá-lo como em vida.

Ao meu orientador Prof. Sony Dimas Bicudo que acreditou em mim, mostrando a sua confiança para a elaboração deste trabalho. Mostrou-se amigo e preocupado com meus interesses. Sua simplicidade e sabedoria tornaram-se um exemplo a seguir, meu respeito e eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ-RARV UNESP-Botucatu-SP pela oportunidade oferecida para realização deste experimento.

À seção de Pós-graduação FMVZ-UNESP-Botucatu-SP, José Roberto, Maria e Patricia pela simpatia com que sempre me atenderam.

Ao Hélio Dias Santos Duarte pela gentileza em ceder seus reprodutores Dorper para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo de A. Machado, Dra. Márjorie de Assis Golim e a técnica Valéria Alves da Silva do Laboratório de Citometria de Fluxo - Hemocentro de Botucatu – Unesp, por ter aberto as portas do laboratório e dado uma oportunidade extremamente importante para enriquecer o nosso experimento no uso da citometria de fluxo.

Ao amigo e orientador do curso de Residência Professor Carlos Antonio de Miranda Bomfim por ter dado a oportunidade em conhecer o Prof. Sony e pelo companheirismo desde da residência da UNESP de Araçatuba até os dias de hoje.

Aos amigos (as) e companheiros (as) de Laboratório Marcel Barbosa Falleiros, Claudia Monteiro (Claudinha), Sabrina e Carmo pela imensa ajuda nos momentos de colheita e processamento dos ejaculados e pelos momentos de conversa e troca de idéias.

A Letícia Crocomo pelo companheirismo e pelas conversas divertidas.

Aos amigos André, Thiago (Pilho) e Eduardo (Dú Veio) pelos momentos de diversão, apoio e trocas de informações.

A Marciane Maia Silva, apesar da distancia sempre esteve à disposição e trazendo respostas imediatas sobre os Radicais livres e pela colaboração na execução deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação Rodrigo (Ruffles), Camila Louise, Priscilla, Natália, Nina, Bethânia, Jeane, Maria Augusta (Guta), Yeda, Renata, Renata (Alfafa), Elisa, Aline, Fernanda (Piracicaba), Wolff, Carol, Jair, Fernanda, Natalia, Gabriel, Marcel (Braxola), Eduardo (Duroc), Bruna, João, Gustavo, Carla Moya, Ana Izabel, Cely, Yan, Márcio, José Dell'aqua, Camila Dell'aqua,

pelos momentos de descontração e apoio durante o período de realização do experimento.

Aos docentes do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, professoras Maria Denise Lopes, Eunice Oba, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga e professores Cezinande de Meira\, Frederico Ozanan Papa, João Carlos Pinheiro Ferreira, Nereu Carlos Prestes e Marco Antonio Alvarenga pelos incentivos, confiança e ensinamentos durante o período de Doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária Maria Cristina Paganini L. Rosa, Edílson de Souza Freire, Marcos Antonio Fumis Pellici, Valter Osvaldo Fabris, José Luiz de Souza, Edivaldo Torquato Gomes e Miguel Alves da Silva pela ajuda durante o experimento.

A todas as pessoas de forma direta ou indireta que contribuíram para a execução desta dissertação.

MUITO OBRIGADO !!!!

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...
E a vida é muito para ser insignificante”*

Charles Chaplin

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Médias $\pm$ erro padrão dos parâmetros da cinética espermática avaliados no sistema computadorizado, morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas do sêmen ovino refrigerado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).....	35
Tabela 2:	Médias $\pm$ erro padrão dos parâmetros da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado, morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas pós-descongelação do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).....	37
Tabela 3:	Médias $\pm$ erro padrão dos parâmetros da cinética espermática avaliados no sistema computadorizado, morfologia espermática e integridade total das membranas espermáticas no sêmen ovino refrigerado nos meios diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox [®] (GGL5 _{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5 _{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Glutathiona (GGL5 _{GSH}).....	50

TABELA 4:	Médias $\pm$ erro padrão dos parâmetros da cinética espermática avaliados no sistema computadorizado e morfologia espermática pós-descongelção no sêmen ovino congelado nos meios diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox [®] (GGL5 _{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5 _{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Glutathione (GGL5 _{GSH}).....	53
-----------	---	----

TABELA 5:	Médias $\pm$ erro padrão, do percentual de células nas categorias de integridade das membranas espermática avaliadas por citometria de fluxo pós-descongelção no sêmen ovino congelado nos meios diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox [®] (GGL5 _{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5 _{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Glutathione (GGL5 _{GSH}).....	56
-----------	--	----

TABELA 6:	Médias $\pm$ erro padrão das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico (TBARS) nos meios diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox [®] (GGL5 _{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5 _{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Glutathione (GGL5 _{GSH}). Valores expressos em nmol/mL de meio diluidor.....	57
-----------	---	----

TABELA 7:	Médias $\pm$ erro padrão das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico (TBARS) pós-descongelamento no sêmen ovino congelado nos meios diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox [®] (GGL5 _{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5 _{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Glutathione (GGL5 _{GSH}). Valores expressos em nmol/10 ⁸ espermatozoides.....	59
TABELA 8:	Resumo da análise de variância da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado do sêmen ovino refrigerado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).....	102
TABELA 9:	Resumo da análise de variância da morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas do sêmen ovino refrigerado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).....	103

TABELA 10: Resumo da análise de variância da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).....	104
TABELA 11: Resumo da análise de variância da morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).....	105
TABELA 12: Resumo da análise de variância da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado do sêmen ovino refrigerado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox [®] (GGL5 _{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5 _{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo e suplementado com Glutathiona (GGL5 _{GSH}).....	106

TABELA 13: Resumo da análise de variância da morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas do sêmen ovino refrigerado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox [®] (GGL5 _{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5 _{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo e suplementado com Glutathione (GGL5 _{GSH}).....	107
TABELA 14: Resumo da análise de variância da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox [®] (GGL5 _{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5 _{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo e suplementado com Glutathione (GGL5 _{GSH}).....	108
TABELA 15: Resumo da análise de variância da morfologia espermática do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox [®] (GGL5 _{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5 _{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo e suplementado com Glutathione (GGL5 _{GSH}).....	109

TABELA 16: Resumo da análise de variância da morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas por citometria de fluxo do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox [®] (GGL5 _{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5 _{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo e suplementado com Glutathione (GGL5 _{GSH}).....	109
TABELA 17: Resumo da análise de variância das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox [®] (GGL5 _{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5 _{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo e suplementado com Glutathione (GGL5 _{GSH}).....	110

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Fluxograma experimental do processamento do sêmen submetido aos tratamentos com GGL com 20% de gema de ovo (GGL20), GGL com 15% de gema de ovo (GGL15), GGL com 10% de gema de ovo (GGL10) e GGL com 5% de gema de ovo (GGL5)..... 30
- Figura 2: Gráfico de pontos gerados pela análise de 20.000 células por citometria de fluxo. Amostra impregnadas com a associação dos fluocromos PI e FITC-PSA. **UL – CAT 1** - membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida; **UR – CAT 2** - membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida; **LL – CAT 3** - membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida; **LR – CAT 4** - membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida..... 44
- Figura 3: Fluxograma experimental do processamento do sêmen submetido aos tratamentos GGL com 5% de gema de ovo (GGL5), GGL com 5% de gema de ovo e Trolox[®] (GGL5_{TRO}), GGL com 5% de gema de ovo e Catalase (GGL5_{CAT}) e GGL com 5% de gema de ovo e Glutathione (GGL5_{GSH})..... 47

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1. Criopreservação do sêmen.....	8
2.2. A gema de ovo como constituinte do meio diluente.....	10
2.3. Estresse oxidativo.....	13
2.3.1. Radical Hidroxila.....	13
2.3.2. Ânion superóxido.....	14
2.3.3. Peróxido de hidrogênio	14
2.4. ROS vs espermatozóide	14
2.5. Ação dos antioxidantes no sêmen.....	16
2.5.1. Trolox®	16
2.5.2. Catalase	17
2.5.3. Glutathione ou Glutathione reduzida (GSH).....	17
2.6. Lipoperoxidação.....	19
2.7. Sondas fluorescentes	19
2.8. Citometria de fluxo.....	22
3. HIPÓTESE.....	24
4. OBJETIVO.....	24
5. EXPERIMENTO 1.....	25
5.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1.1. Local do experimento.....	25
5.1.2. Carneiros.....	25
5.1.3. Colheita do sêmen.....	26
5.1.4. Avaliação do sêmen.....	26
5.1.5. Análise de integridade total das membranas espermáticas.....	27
5.1.6. Análise da morfologia espermática.....	27
5.1.7. Processamento do sêmen.....	28
5.1.8. Descongelamento do sêmen.....	29

5.1.9. Delineamento experimental.....	29
5.1.10. Análise estatística.....	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
7. EXPERIMENTO 2	40
7.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
7.1.1. Local do experimento.....	40
7.1.2. Carneiros.....	40
7.1.3. Colheita do sêmen.....	41
7.1.4. Avaliação do sêmen.....	41
7.1.5. Análise de integridade total das membranas espermáticas.	41
7.1.6. Análise da morfologia espermática.....	41
7.1.7. Processamento do sêmen.....	42
7.1.8. Descongelação do sêmen.....	43
7.1.9. Avaliação da integridade da membrana plasmática e reação acrossomal por citometria de fluxo pós-descongelação.....	43
7.1.10. Quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática.....	44
7.1.11. Delineamento experimental.....	46
7.1.12. Análise estatística.....	48
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
9. CONCLUSÕES.....	61
10. BIBLIOGRAFIA.....	62
11. TRABALHO CIENTÍFICO.....	78
12. ANEXO I.....	96
12.1. Meio para congelação do sêmen.....	96
12.2. Sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio (HARRISON & VICKERS, 1990).....	97
12.3. Solução de PBS e solução de glutaraldeído a 0,2% (BARTH & OKO, 1989).....	98
12.4. Ensaio da Lipoperoxidação pelo método TBA	99
12.5. “ Hamilton Thorne setup for IVO12.3.....	102
13. ANEXO II	103
14. ANEXO III	107
15. ANEXO IV	112

RESUMO

RODELLO, L. Prevenção do estresse oxidativo pela utilização de Trolox[®], Catalase e Glutathione no processo de criopreservação de sêmen ovino. Botucatu, 2010. 113p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Objetivou-se estudar as implicações da redução na proporção de gema de ovo no meio diluidor Glicina-Gema-Leite e testar a prevenção do estresse oxidativo utilizando os antioxidantes Trolox[®], Catalase ou Glutathione no processo de criopreservação de sêmen ovino. No **Experimento 1**, determinou-se o efeito da redução na proporção da gema de ovo no meio diluidor Glicina-Gema-Leite, utilizando-se quatro ejaculados de cada carneiro das raças Santa Inês (n=4) e Dorper (n=4), colhidos por meio de vagina artificial. Após as avaliações macro e microscópicas, o sêmen foi mantido sob temperatura de 32°C e diluído para atingir-se concentração de 400×10^6 espermatozoides/mL no meio Glicina-Gema-Leite contendo 20% (GGL20), 15% (GGL15), 10% (GGL10) ou 5% (GGL5) (v/v) de gema de ovo. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, e em seguida, as amostras foram refrigeradas e congeladas em sistema com controle automatizado. A descongelação foi feita em banho-maria à 40°C/20 segundos. A cinética espermática foi determinada em sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA) e a integridade total das membranas espermáticas pela combinação dos fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e iodeto de propídio (IP). Na análise pós-descongelação, as motilidades total (MT) e progressiva (MP) nos tratamentos GGL10 e GGL5 foram maiores ($P < 0,05$) do que no GGL20. A VAP foi menor em GGL20 dos demais meios ($P < 0,05$) e a VSL foi maior em GGL5 do que em GGL20 ($P < 0,01$). A VCL e o ALH apresentaram maiores valores no GGL10 e GGL5 do que no GGL15 e GGL20 ($P < 0,01$). O BCF no GGL5 foi maior ($P < 0,05$) do que nos demais diluidores e o sêmen criopreservado nos meios GGL10 e GGL5 apresentaram maior percentual de espermatozoides com membranas íntegras do que no meio GGL20 ($P < 0,05$). Frente aos resultados obtidos, o GGL5 foi utilizado como meio base no experimento seguinte. No

Experimento 2, foi determinado o efeito da utilização dos antioxidantes em meio com reduzida proporção de gema de ovo. Os tratamentos delineados foram: GGL5 (controle); GGL5_{TRO} (GGL5 + Trolox[®], 100μMol/100 x10⁶ espermatozóides totais), GGL5_{CAT} (GGL5 + Catalase, 12,5mg/mL) e GGL5_{GSH} (GGL5 + Glutathione reduzida, 5mM/100 x10⁶ espermatozóides totais). Foram utilizados cinco carneiros da raça Dorper sendo colhidos, por meio de vagina artificial, cinco ejaculados de cada reprodutor. Os procedimentos de diluição, envasamento, refrigeração, congelamento e descongelamento foram semelhantes aos do Experimento 1. Após a descongelamento, a cinética espermática foi determinada em sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA), a integridade total das membranas espermáticas pela combinação dos fluorocromos iodeto de propídio (IP) e aglutinina de *pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA) em citometria de fluxo e a lipoperoxidação foi avaliada pela técnica dos TBARS. A adição de antioxidantes não incrementou (P<0,05) as MT e MP e as VAP e VCL. Obtiveram-se menores valores (P<0,05) na VSL pela adição de Glutathione (GGL5_{GSH}) em relação ao controle (GGL5). A adição de Catalase (GGL5_{CAT}) resultou em menor (P<0,05) deslocamento lateral de cabeça (ALH) e maior percentual (P<0,05) de espermatozóides com membranas plasmática e acrossomal íntegras em relação ao controle (GGL5). Não houve diferença (P<0,05) nos níveis de lipoperoxidação espontânea entre os tratamentos, entretanto, o Trolox[®] foi eficiente em prevenir a peroxidação induzida. Constatou-se ser possível a redução na proporção de gema de ovo do meio diluidor Glicina-Gema-Leite bem como a adição de Trolox[®] (100μMol/100 x10⁶ espermatozóides totais) ou Catalase (12,5mg/mL), por seus efeitos benéficos sobre alguns dos parâmetros quali quantitativos do sêmen ovino criopreservado.

Palavras chave: Antioxidante; Catalase Trolox[®]; Citometria de fluxo; Criopreservação; Estresse oxidativo; Gema de ovo; Glutathione; Lipoperoxidação.

ABSTRACT

RODELLO, L. Prevention of oxidative stress by application Trolox[®], Catalase and Glutathione in the process of cryopreservation of ovine semen. Botucatu, 2010. 113p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

The objective of the study was the implications of the reduction in the proportion of egg yolk in the extender Glycine-Yolk-Milk and to test the prevention of oxidative stress using antioxidants Trolox[®], Catalase or glutathione in the process of cryopreservation of ovine semen. In **Experiment 1**, we determined the effect of reduction in the proportion of egg yolk in the extender Glycine-yolk-milk, using four ejaculates from each ovine of Santa Inês breed (n=4) and Doper breed (n=4), collected using artificial vagina. After the assessment, macro and microscopic, semen was kept at a temperature of 32°C and diluted to achieve concentrations up to 400×10^6 sperm / mL in the extender Glycine-yolk-milk containing 20% (GGL20), 15% (GGL15), 10% (GGL10) ou 5% (GGL5) (v/v) of egg yolk. The semen was stored in straws of 0.25 mL, and then, samples were refrigerated and frozen in system with automated control. Thawing was done in a water bath to 40°C/20 seconds. The kinetics was determined in sperm computerized semen analysis (CASA) and the overall integrity of sperm membranes by the combination of fluorochromes carboxyfluorescein diacetate (DIC) and propidium iodide (IP). In analyzing post-thawing, motilities total (MT) and progressive (MP) in the treatments GGL10 and GGL5 were higher ($P < 0.05$) than in GGL20. The VAP was lower in GGL20 of other means ($P < 0.05$) and VSL was higher in GGL20 than in GGL20 ($P < 0.01$). The VCL and ALH showed higher values in GGL10 and GGL5 than in GGL15 and GGL20 ($P < 0.01$). The BCF in GGL5 was higher ($P < 0.05$) than in the other extenders and cryopreserved semen in the environments GGL10 and GGL5 showed higher percentages of spermatozoon with intact membranes than in the extender GGL20 ($P < 0.05$). Given our results, the GGL5 was used as a base extender in the experiment following. In **Experiment 2**, we

determined the effect of the use of antioxidants in extender with low proportion of egg yolk. The treatments were designed: GGL5 (control); GGL5_{TRO} (GGL5 + Trolox[®], 100 μ Mol/100 $\times 10^6$ total sperm), GGL5_{CAT} (GGL5 + Catalase + 12.5 mg / mL) and GGL5_{GSH} (GGL5 + Glutathione, 5mM/100 $\times 10^6$ total sperm). We used five of the Dorper sheep being collected, by means of artificial vagina, five ejaculates from each breeder. Dilution procedures, bottling, refrigeration, freezing and thawing were similar to those of Experiment 1. After thawing sperm kinetics was determined in computerized semen analysis (CASA), the full integrity of sperm membranes by the combination of fluorochromes propidium iodide (IP) and *Pisum sativum* agglutinin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC-PSA) in flow cytometry and lipoperoxidation was analyzed by the TBARS. The addition of antioxidants did not increase ($P < 0.05$) the MT and MP and VAP and VCL. They obtained lower values ($P < 0.05$) in the VSL by the addition of glutathione (GGL5_{GSH}) compared to control (GGL5). The addition of catalase (GGL5_{CAT}) resulted in lower ($P < 0.05$) of lateral head displacement (ALH) and a higher percentage ($P < 0.05$) with sperm plasma membrane and acrossomal integrity compared to control (GGL5). There wasn't difference ($P < 0.05$) in spontaneous lipoperoxidation levels between treatments, however, the Trolox[®] was effective in preventing peroxidation induced. It was found possible reduction in the proportion of egg yolk extender Glycine-yolk-milk and the addition of Trolox[®] (100 μ Mol/100 $\times 10^6$ total sperm) or Catalase (12.5 mg / mL), for its beneficial effects on some of the quality quantitative parameters of semen cryopreserved ovine.

Key words: Antioxidant; Catalase Trolox[®]; Flow cytometry; Cryopreservation; Oxidative stress; Egg yolk; Glutathione, Lipid peroxidation.

1. INTRODUÇÃO

A aplicação de biotécnicas de reprodução assistida em pequenos ruminantes, como a criopreservação de sêmen, inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV), têm sido muito importante para o aproveitamento do potencial genético de animais geneticamente superiores, promovendo maior impacto aos programas de melhoramento animal.

O processo de criopreservação é extremamente complexo e vários são os fatores que podem influenciar seus resultados, havendo sempre uma subpopulação de espermatozóides não adaptados a tal processo.

Existe grande variabilidade de resposta das amostras a serem processadas durante as etapas de refrigeração, congelação e descongelação (OLLERO et al., 1998), sendo as alterações na composição da membrana dos espermatozóides, distribuição de fosfolipídios e colesterol (WHITE, 1993) e a razão entre a quantidade de ácidos graxos saturados e insaturados, fatores que atuam diretamente na qualidade final do sêmen criopreservado (SALAMON & MAXWELL, 1995; SALAMON & MAXWELL, 2000).

O diluïdor ou meio de congelação exerce importante papel no processo da criopreservação e a variação em sua composição influencia as taxas de sobrevivência espermática após a congelação/dcongelação. Nas ultimas décadas, dezenas de formulações de meios diluidores têm sido propostas e vários tipos de substâncias crioprotetoras foram incorporadas em suas composições. As substâncias, com reconhecida ação crioprotetora, atualmente mais utilizadas são a gema de ovo e o glicerol.

Devido a seu efeito benéfico sobre a conservação de espermatozóides (SALAMON & MAXWELL, 1995), a incorporação de gema de ovo (1,5 a 50%) aos diluidores é de uso consagrado sendo o constituinte mais prevalente em boa parte das formulações. A gema de ovo associada a outros ingredientes previne o choque térmico, preserva a motilidade e a integridade das membranas plasmáticas e acrossomal (AMIRAT et al., 2004). Atua também, como um protetor osmótico, permitindo uma maior tolerância dos espermatozóides a soluções hipo e hiperosmóticas. A proteção que exerce durante a congelação se deve a sua adesão à membrana plasmática,

especialmente dada pela fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL) (WATSON, 1975; MOUSSA et al., 2002; BERGERON & MANJUNATH, 2006).

Porém, nos últimos anos a sua utilização tem sido questionada devido a variabilidade em sua composição e risco sanitário em veicular agentes microbiológicos específicos para regiões isentas, conseqüente à deficiente rastreabilidade de sua origem. Há também um constante risco potencial de contaminação por microorganismos como bactérias e micoplasmas, que podem acarretar na geração de endotoxinas deletérias à capacidade fertilizante do espermatozóide (BOUSSEAU et al., 1998; GIL et al., 2003).

Atribui-se a gema de ovo efeito de redução na integridade acrossomal em bodes (ABOAGLA & TERADA, 2004), e altas concentrações reduzem a viabilidade espermática pós-descongelamento em bodes, carneiros (SALAMON & MAXWELL, 1995) e búfalos (KUMAR et al., 2003).

O papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido enfatizado na reprodução e apesar de participar efetivamente do processo fisiológico da capacitação e reação acrossomal, a sua produção exagerada é prejudicial ao espermatozóide.

As modificações morfofuncionais impostas aos espermatozoides pela criopreservação são semelhante a da capacitação espermática, devido ao aumento da permeabilidade das membranas e aumento da produção de ROS (MEDEIROS et al., 2002).

O ejaculado possui um sistema "redox" que combina a ação antioxidante do plasma seminal e espermatozoides. Participam do sistema, mecanismos enzimáticos (superóxido dismutase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e catalase) e não enzimático (glutathione reduzida – GSH, urato, ácido ascórbico, vitamina E, taurina, hipotaurina, carotenóides e ubiquinonas). A interrelação entre mecanismos antioxidante e pró-oxidante do sêmen determinam a porcentagem total de peroxidação lipídica do espermatozóide.

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de ROS (SIES, 1986). Devido ao reduzido citoplasma e às altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) em suas membranas os espermatozoides são sensíveis à ação dos ROS (HAMMERSTEDT et al., 1990). Tem sido constatado que a peroxidação lipídica dos PUFAs diminui a fluidez e a flexibilidade da membrana comprometendo a

fertilidade espermática do homem (de LAMIRANDE e GAGNON, 1992 e 1995), touro (BECONI, et al., 1991), cachaço (CEROLINI et al., 2000) e carneiro (JONES & MANN, 1977).

A toxicidade da ROS é mediada pelo ataque oxidativo do grupo carbono metilênico bis-alílico a ligação dos PUFAs e fosfolipídios provocando inativação de proteínas, lipídios e carboidratos, diminuindo a motilidade (de LAMIRANDE & GAGNON, 1992 e 1995), inibição da respiração, danos ao DNA (AITKEN et al., 1998), alteração do citoesqueleto, que reduz a capacidade de fusão dos gametas e a fertilidade (GUERRA et al., 2004). Devido a inabilidade dos espermatozóides em resintetizar os PUFAs e a ineficiência do sistema antioxidante (HAMMERSTEDT et al., 1990), a lipoperoxidação durante a criopreservação tem sido contornada processando o sêmen sob condições anaeróbicas ou realizando-se a adição de antioxidantes (AITKEN, 1995).

Neste contexto propôs-se estudar alternativas à prevenção do estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado tendo como estratégias variações no processo de congelamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criopreservação do sêmen

A criopreservação dos espermatozóides de muitas espécies leva a uma série de alterações que potencialmente pode resultar em marcante redução da fertilidade quando comparada a do sêmen a fresco. As lesões nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial foram indicadas como as principais causas de danos estruturais e de perdas funcionais, impostas pela criopreservação (VALCARCEL, 1997).

Segundo Salamon e Maxwell (1995) apesar de 40 a 60% dos espermatozóides de carneiros apresentarem motilidade pós-descongelação, somente 20 a 30% deles permanecem biologicamente inalterados. Os danos básicos que os espermatozóides sofrem durante o processo de congelação/descongelação podem ser ultra-estruturais ou físicos, bioquímicos ou funcionais. Os espermatozóides podem estar móveis, mas danificados, de tal maneira que a fertilização seja improvável.

Segundo Singer e Nicholson (1972), o modelo estrutural básico das membranas espermáticas é a de um mosaico fluído, formado por duas camadas de fosfolipídios, não sendo uma estrutura contínua, por ser interrompida por numerosas proteínas integrais, intercaladas nesta estrutura. Na maior parte da membrana, a organização de lipídios, glicolipídios, proteínas e glicoproteínas apresenta-se de maneira assimétrica em relação à distribuição de moléculas específicas nas faces externa e interna. As proteínas e glicoproteínas da membrana celular são dispostas de forma heterogênea e que podem ser divididas em duas classes distintas: integrais ou intrínsecas e periféricas ou extrínsecas.

O estado de fluidez das membranas espermáticas é um pré-requisito para o desempenho de suas funções. Os principais fatores que afetam a fluidez são a composição relativa de fosfolipídios/colesterol e a temperatura à qual a membrana é exposta. Os lipídios e as proteínas de membrana que permanecem em um estado de fluidez, permitindo assim, a movimentação livre dos componentes na membrana sofrem com a queda contínua de temperatura

durante a congelação. As mudanças de temperatura produzem alterações físicas da membrana fazendo com que ela passe do estado líquido ao de gel, tornando-se uma estrutura rígida, com áreas fracas e susceptíveis a rupturas (HAMMERSTED et al., 1990).

Este fenômeno pode assumir proporções exageradas durante a refrigeração, onde alguns lipídios atingem temperaturas transacionais bem antes dos outros, levando a uma dispersão rápida da fase de gel (WOLFE et al., 1998).

Alterações na motilidade e na estrutura dos espermatozóides ocorrem simultaneamente nas diferentes etapas de congelação e descongelação. É bem conhecido que o resfriamento rápido do sêmen de 30 para 0°C (WATSON, 2000), ou até mesmo a redução rápida da temperatura de 37°C para 5°C induz a um estresse letal para algumas células, que é proporcional à taxa de resfriamento, intervalo de temperatura e ao limite de temperatura atingido. Este processo é conhecido como choque térmico (WATSON, 2000).

No choque térmico as alterações incluem o decréscimo da utilização glicólise, da frutólise e conseqüentemente, redução da respiração celular, aumento da degeneração do ácido desoxirribonucléico (DNA) e liberação de enzimas e lipídios para o meio extracelular, a partir dos espermatozóides. Essas alterações estão associadas com a geração de estresse oxidativo e de espécies reativas de oxigênio - ROS (CHATTERJEE et al., 2001). As lesões estruturais iniciam-se na membrana plasmática atingindo posteriormente a membrana acrossomal e por último às membranas mitocondriais (WATSON, 2000).

Os efeitos da congelação/dcongelação na função espermática são semelhantes aos da capacitação espermática, devido ao aumento da permeabilidade das membranas e aumento da produção de ROS (MEDEIROS et al., 2002).

Alguns dos elementos do citoesqueleto também são termo-sensíveis. A congelação das células resulta em uma despolimerização dos filamentos de actina. Segundo Spungin et al. (1995) e Brener et al. (2003), a despolimerização da F-actina do citoesqueleto é uma etapa importante da capacitação e da reação acrossomal, permitindo a aproximação das membranas plasmática e acrossomal promovendo a exocitose das enzimas

acrossomais, então a criopreservação contribui para a desorganização das membranas antecipando o processo de capacitação e reação acrossomal (BRENER et al., 2003).

2.2. A gema de ovo como constituinte do meio diluente

Os meios diluidores além de aumentarem o volume seminal, permitindo seu fracionamento, exercem papel fundamental na preservação do sêmen, tanto no processo de refrigeração quanto no de congelação (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Sem o emprego de diluentes não é possível preservar o sêmen por mais do que algumas horas. Dentre os efeitos benéficos destas soluções encontram-se: prolongamento da sobrevivência espermática através da estabilização de sistemas enzimáticos e manutenção da integridade das membranas; proteção das células de condições ambientais desfavoráveis como a do choque térmico, efeitos nocivos do plasma seminal e substâncias tóxicas produzidas pelo metabolismo espermático; assim como prevenção ou controle do crescimento de microrganismos (KATILA, 1997).

Os diluidores que demonstram eficácia, no processo de criopreservação, têm em sua composição um sistema tampão (Citrato, Tris, Tes Hepes, Mop, Mes, Pipes); uma fonte de fatores protéicos de crioproteção (a base de gema de ovo ou leite); crioprotetor (glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfoxido e amidas), açúcares (monossacarídeos - glicose, manose, frutose; dissacarídeos – sacarose, lactose) e diversos aditivos, como antioxidantes e aminoácidos (glicina), bem como antibióticos (SALAMON & MAXWELL, 2000; ALVARENGA et al., 2005).

Um bom diluidor se caracteriza por ser atóxico aos espermatozóides, apresentar osmolaridade igual ou próxima àquela encontrada no sêmen *in natura*, grau de acidez ou alcalinidade favorável à vida dos espermatozóides (SALAMON & MAXWELL, 2000; VISHWANATH & SHANNON, 2000).

O uso de meio diluente tem por objetivo proteger os espermatozóides dos choques térmico e/ou osmótico que ocorrem durante os processos de refrigeração, congelação e descongelação, já que estes podem causar danos irreversíveis aos espermatozóides, devido à formação de cristais de gelo

intracelular que afetam a estrutura físico-química da célula, causando danos, principalmente, à membrana, ao acrossomo e ao metabolismo energético (PICKETT et al., 1987), afetando o tempo de sobrevivência no genital da fêmea.

Algumas das classes de diluidores utilizadas na criopreservação do sêmen ovino baseiam-se em formulações recomendadas por Cortell (1973), a base de leite desnatado e glicose (GL), por Evans e Maxwell (1987), a base de Tris-gema (Tris); e por Gonzalez (1996), a base de Glicina-gema-leite (GGL).

As células espermáticas necessitam para sua sobrevivência ao processo de criopreservação, de um ou mais agentes crioprotetores, que são classificados em agentes crioprotetores não penetrantes ou extracelulares e agentes crioprotetores penetrantes ou intracelulares (MAZUR, 1984).

Acredita-se que a proteção ao choque térmico oferecida pela gema de ovo seja devida à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que se aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando, com isso, a membrana do espermatozóide (FOULKES, 1977; WATSON, 1981; MOUSSA et al., 2002). Dessa forma, a gema de ovo atua na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolípidos e, aparentemente, induzindo alteração transitória de sua composição, prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTARD, 1996). Os fosfolípidos que compõem a fração LDL da gema de ovo protegem o sêmen, especificamente durante o processo de refrigeração a 5 °C.

A prevenção ao choque térmico conferida pelos lipídeos, parece estar relacionada a quelação do íon Ca^{+2} do meio, evitando sua entrada no espermatozóide. É possível que os lipossomas interajam com o cálcio e outros componentes do meio de congelamento que afetam a tonicidade ou com a fração da água não congelada durante a fase de cristalização (WILHELM et al., 1996).

As amostras de gema de ovo comumente utilizadas na congelamento de sêmen constituem, em média, 15 a 30% do volume total. Essa variação na concentração é baseada em resultados onde o percentual de espermatozoides móveis após congelamento e descongelamento foi similar nesta faixa de concentrações. É possível obter-se sucesso na congelamento sem adição de glicerol, sendo necessário utilizar concentrações muito elevadas de gema de ovo, cerca de 30% (SALAMON & MAXWELL, 2000). As concentrações de

gema de ovo rotineiramente utilizadas nos meios diluidores têm variado de 1,5 a 50% (WATSON, 2000; SALAMON & MAXWELL, 2000) e sua redução é de grande interesse, uma vez que a combinação de gema de ovo e glicerol poderia promover uma estabilização ou desestabilização das membranas dependendo da concentração e do tempo de exposição dos espermatozóides frente a estes dois componentes (KATKOV et al., 1998), podendo gerar como consequência, uma maior produção de ROS (MORANI, 2004). Na atualidade, devido a crescente preocupação no controle sanitário envolvendo a comercialização do sêmen, tem aumentado as discussões sobre a presença da gema de ovo no meio diluidor, devido à variabilidade em sua composição e ao risco sanitário em veicular agentes microbiológicos específico para regiões isentas.

Além disso, com o uso da gema de ovo, há um constante risco de contaminação por microorganismos como bactérias e micoplasmas, que podem acarretar na geração de endotoxinas deletérios à capacidade fertilizante do espermatozóide (BOUSSEAU et al., 1998; THIBIER & GUERIN, 2000; GIL et al., 2003).

Manjunath et al.,(2002) e Bergeron e Manjunath (2006) relataram que animais apresentando uma quantidade elevada de determinadas proteínas no plasma seminal denominadas de Proteínas do Plasma seminal Bovino (BSPs) e Proteínas do Plasma Seminal Ovino (RSPs), apresentam baixa viabilidade espermática pós-descongelação. Postulou-se que estas proteínas ligam-se a membrana do espermatozóide, provocando alterações de modo a determinar baixa resistência ao choque térmico e a congelação. Entretanto, estas BSPs e RSPs são facilmente seqüestradas pelas lipoproteínas presentes na gema de ovo, determinando a não ligação destas proteínas do plasma seminal com as membranas. Portanto, altas concentrações destas proteínas acarretariam alterações nas membranas não conferindo proteção ao choque térmico.

A uniformidade na preparação dos diluidores de sêmen contendo gema de ovo é difícil de ser atingida devido às suas características individuais, como idade do ovo e tipo de alimentação das aves.

Gil et al. (2000) demonstraram que melhores índices de viabilidade espermática foram obtidos quando o sêmen ovino foi congelado com meio a base de leite de vaca e com quantidades reduzidas de gema de ovo (5%),

comparando ao meio Tris com 20% de gema de ovo. Segundo Gil et al. (2003), com base em estudos de concentrações de 5, 10, 15 e 20% de gema de ovo em meio a base de leite, nenhum efeito benéfico é obtido pela utilização de gema em quantidades acima de 10%.

Realizando análises microbiológicas em meios diluidores comerciais acrescidos de gema, Bousseau et al. (1998) encontraram contaminação (10-60 CFU/mL) por agentes bacterianos ou associados a micoplasma, mesmo na presença de antibióticos de larga espectro de ação.

2.3. Estresse oxidativo

Estudos indicam que durante o processo de criopreservação, grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas, concomitantemente, à diminuição dos sistemas de defesas antioxidantes que o sêmen possui para prevenir-se dos efeitos danosos das ROS, entre eles a peroxidação lipídica (BAILEY et al., 2000; MORANI, 2004).

As ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Entre as espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxila ($OH^\bullet$), o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são considerados os mais importantes (NORDBERG & ARNER, 2001).

2.3.1. Radical hidroxila

Dentro dos sistemas biológicos é o radical mais reativo e o que causa mais dano entre os ROS. Este radical é formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons de metais (Fe^{2+} ou Cu^+), geralmente ligados em complexos com proteínas como a ferritina (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNER, 2001).

2.3.2 Ânion superóxido

O ânion superóxido é um radical livre, gerado a partir da molécula de oxigênio pela adição de um elétron, não é altamente reativo, pois não consegue penetrar em membranas lipídicas, ficando restrito ao compartimento onde é produzido. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente no ambiente aeróbico, durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos e eosinófilos, rico em elétrons, especialmente na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNER, 2001).

2.3.3. Peróxido de hidrogênio

O H_2O_2 não é um radical livre, mas sim um metabólito do oxigênio altamente deletério. Causa mais danos aos espermatozóides *in vitro*, que os demais, principalmente devido á sua alta capacidade em penetrar nas membranas biológicas (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992; AITKEN et al., 1993).

O peróxido de hidrogênio é também responsável pela formação do radical hidroxila. O principal metal responsável pela transformação do H_2O_2 em $OH^\bullet$ é o ferro, onde ocorre a reação de uma molécula de Fe^{2+} e uma molécula de H_2O_2 , produzindo uma molécula de $OH^\bullet$, uma de OH e uma de Fe^{3+} , chamado de reação de Fenton.

O H_2O_2 produzido pode ser removido por três sistemas enzimáticos antioxidantes: catalase, glutathione peroxidase e peroxiredutases (NORDBERG & ARNER, 2001).

2.4 ROS vs Espermatozóide

A célula espermática é altamente sensível aos danos causada pelas ROS, devido á alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) presentes em sua membrana plasmática e um citoplasma reduzido, que mantem baixas concentrações de enzimas antioxidantes (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1995).

Os danos produzidos nas proteínas, modificações do citoesqueleto e alterações de alguns mecanismos celulares, é devido a alta reatividade dos ROS (SHARMA & AGARWAL, 1996).

Segundo Gomes et al. (1998), em humanos a produção de ROS ocorre principalmente em espermatozóides anormais, que possuem resíduos de citoplasma (gotas citoplasmática proximal e distal). Aitken e Baker (2002) justificam que a presença deste resíduo citoplasmático em células imaturas são responsáveis por gerar nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida (NADPH), que serve como fonte de elétrons para a produção de ROS.

Outros fatores responsáveis pela maior produção de ROS no sêmen, seriam os espermatozóides imóveis e os normais, porém funcionalmente anormais, os quais estas células provavelmente estariam com o seu sistema antioxidante inativado (ENGEL et al., 1999).

Dentro de um processo fisiológico normal, a ROS tem um papel importante para a regulação da taxa de hiperativação, para a realização da capacitação espermática, reação acrossomal e para a fusão espermatozóide/oócito (AITKEN et al., 1991; SENGOKU et al., 1998).

Um desbalanço entre a produção e a eliminação de ROS no sêmen acarreta efeitos prejudiciais ao espermatozóide, chamado de estresse oxidativo, que é definido como um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de ROS (SIES, 1986; DE LAMIRANDE & GAGNON, 1995).

Em sêmen humano, a maior fonte de ROS são os leucócitos, presentes mesmo em homens férteis (KESSOPUOLOS et al., 1994), porém Wolff et al. (1995), verificaram que as ROS geradas por leucócitos, são deletérias para as células espermáticas apenas em infecções agudas de testículo e epidídimo, nas quais o sistema antioxidantes não estaria atuando.

A diminuição da motilidade espermática causada pela ROS se deve, principalmente a uma cascata de eventos que resultam em uma diminuição da fosforilação de proteínas do axonema e a imobilização dos espermatozóides, ambos relacionados com uma redução na fluidez e flexibilidade da membrana plasmática. Outro fator seria a difusão do H₂O₂ na célula, através das membranas mitocondrial e/ou plasmática, inibindo a atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase, que controla o fluxo de glicose que, por sua vez,

controla a disponibilidade da NADP-H e consequentemente a produção de ATP (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1995).

2.5. Ação dos antioxidantes no sêmen

Define-se antioxidante como uma substância que presente, em baixas concentrações, quando comparadas com as de um substrato oxidável, retarda ou previne de maneira significativa a oxidação deste substrato (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Segundo Saleh e Agarwal (2002), os mecanismos de defesa antioxidante celular exercem a proteção através, basicamente de três linhas; da prevenção, do combate e do reparo das reações de oxidação.

A primeira linha de defesa contra a oxidação é a prevenção por meio de controle a quelação de metais de transição, que ocorre ao se soltarem dos produtos da redução do oxigênio, produzindo oxidantes secundários ainda mais reativos, como por exemplo, o radical hidroxila (SALEH & AGARWAL, 2002).

O combate às ROS se baseia na quebra da reação em cadeia dos radicais livres para a formação de produtos oxidantes. Este combate é promovido pela ação de certos antioxidantes, que impedem a formação de radicais, isto é, substâncias com elétrons despareados (SIES, 1993; SALEH e AGARWAL, 2002).

A terceira linha é a de reparo aos danos provocados por agentes oxidantes. Nos espermatozóides, este reparo se torna mais difícil devido a grande quantidade de PUFA's em sua membrana e a falta de sistemas de enzimas citoplasmáticas, tornando mais susceptível a lipoperoxidação (AITKEN et al., 1989; SALEH & AGARWAL, 2002).

2.5.1. Trolox®

O 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico, depois nomeado Trolox®, é um análogo hidrossolúvel do tocoferol que foi sintetizada por Scott e sua equipe em 1974. Esta substância apresenta propriedades antioxidantes

maiores que a do α e γ -tocoferol, tanto em gordura animal quanto vegetal (CORT et al., 1975).

O mecanismo de ação do efeito antioxidante do Trolox[®] é semelhante ao da vitamina E, ou seja, envolve o OH fenólico e a remoção de radicais peroxil (ALBERTINI & ABUJA, 1999).

Sua estrutura é composta por um núcleo “croman”, semelhante ao do α -tocoferol, e um grupo ácido carboxílico no carbono 2 (REZK et al., 2004).

A maioria das ROS, por exemplo, o ânion superóxido é gerado em fase aquosa. O Trolox[®] tem vantagem sobre os outros antioxidantes que são apenas lipossolúveis, como a vitamina E. Devido a sua estrutura cromonal, que lhe dá atividade antioxidante e ao grupo carboxila, que tem moderado efeito hidrossolúvel, o Trolox[®] é distribuído em ambas às fases da bicamada de lipídios das biomembranas, tornando-se um excelente protetor contra a lipoperoxidação. Além disso, o Trolox[®] pode ser adicionado diretamente à membrana lipídica (membrana intacta) sem a necessidade de solventes ou outros métodos de extração (BARCLAY et al., 1995 *apud* MAIA, 2006).

2.5.2. Catalase

A catalase é uma heme-proteína citoplasmática, e se localiza nos peroxissomos das células de mamíferos, catalisa a redução do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular. Também atua na destoxificação de diferentes substratos (ex. fenóis e álcoois), via redução acoplada do peróxido de hidrogênio (MAIA, 2006).

2.5.3. Glutationa ou glutathione reduzida (GSH)

A Glutationa é um tripeptídeo, é o principal tiol intracelular de baixo peso molecular presente na maioria das células.

A Glutationa (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycine) é um tiol tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina. É distribuída amplamente nas células e é muito importante na fisiologia e metabolismo celular, incluindo a proteção contra o estresse oxidativo, síntese de proteínas e DNA e na fertilização dos

gametas. É um antioxidante endógeno que atua sinergicamente com o α -tocoferol e com o ácido ascórbico, sendo fundamental para mantê-los na forma reduzida (CHATTERJEE et al., 2001).

A GSH é uma molécula encontrada em concentrações milimolares (mM) nas células, consegue reagir diretamente com vários ROS. A GSH é um co-fator da glutathione peroxidase (GSH-PX) que decompõem o H_2O_2 em H_2O e os hidro ou lipoperóxidos em álcool de alquila e produzindo também a glutathione oxidada (GSSG). A GSSG pode ser reduzida novamente para GSH pela enzima glutathione redutase usando o NADPH como co-fator (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Entretanto o nível intracelular deste thiol no espermatozóide é reduzido pela criopreservação (BILODEAU et al., 2001).

Em cachaaos, Gadea et al. (2004), suplementando o meio diluidor a base de lactose e gema de ovo com 5mM de glutathione reduzida (GSH), não tiveram um efeito significativo sobre a motilidade e a integridade de membrana, mas na FIV teve um efeito significativo na taxa de penetração em oócitos ($97,46 \pm 1,46\%$) em dos tratamentos. Concluindo que o uso de GSH a 5mM não trouxe resultado significativos sobre os parâmetros espermáticos, mas mostrou-se eficiente na fertilização.

Bucak e Tekin (2007), acrescentando GSH 5 mM e 10mM, taurina 50mM e 100mM e Trealose 50mM e 100mM ao meio diluidor a base de TRIS para a refrigeração de sêmen ovino, obtiveram os seguintes resultados pós-refrigeração no momento 0 hora. Na motilidade somente o tratamento com 100mM de trealose foi menor ($69,3 \pm 3,4\%$) em comparação GSH 5mM ($80,0 \pm 2,7\%$), GSH 10mM ($81,4 \pm 1,4\%$), taurina 50mM ($76,4 \pm 2,4\%$), taurina 100mM ($77,9 \pm 2,9\%$) e trealose 50mM ($80,0 \pm 2,7\%$). Quanto a viabilidade espermática não houve diferença entre os tratamentos com GSH 5mM ($79,1 \pm 2,4\%$), GSH 10mM ($80,6 \pm 1,5\%$), taurina 50mM ($78,3 \pm 2,6\%$), taurina 100mM ($76,4 \pm 2,6\%$), trealose 50mM ($84,4 \pm 1,1\%$) e trealose 100mM ($79,1 \pm 2,5\%$).

Bucak et al. (2008), estudaram o efeito da adição de 5 mM de glutathione reduzida (GSH), 5mM de glutathione oxidada (GSSG) e 5mM de cisteína sobre os parâmetros de estresse oxidativo em sêmen ovino depois do processo de criopreservação. A adição de cisteína ($61,0 \pm 1,9\%$) proporcionou melhor resultado sobre a motilidade em comparação a GSH ($50,0 \pm 1,58\%$) e GSSH

(48,0±2,55%) e não houve diferença entre os parâmetros de viabilidade e anormalidade de acrossomo, entre os tratamentos.

2.6. Lipoperoxidação

A peroxidação de lipídios parece ser uma das causas da disfunção espermática. Os lipídios da membrana espermática são ricos em ácidos graxos poliinsaturados, que conferem a fluidez e flexibilidade, necessárias para que ocorram os eventos de fusão de membranas associadas com a fertilização (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1999).

A peroxidação de lipídios é definida como “a deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados”. Os PUFA são aqueles que contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono ($H_2C=C_2H$), por isso são um dos componentes mais atingidos pelas ROS (NORDBERG & ARNER, 2001). A iniciação da lipoperoxidação é causada pela ataque a um lipídio por qualquer ROS que tenha reatividade suficiente para seqüestrar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-CH_2-$). O seu término ocorre quando os radicais lipídicos e peroxila ($R-C^\bullet$ e $-ROO^\bullet$) produzidos propagam-se até destruírem a si próprios. O radical hidroxila é indicado como a ROS iniciadora da peroxidação lipídica (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A técnica mais comum usada para medir a lipoperoxidação é o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA), que é um método espectrofotométrico que mede a concentração dos produtos provenientes da peroxidação de lipídios. Durante a fase de iniciação da lipoperoxidação ocorre acúmulo de hidroperóxidos de lipídios na membrana espermática, que se decompõe formando vários aldeídos, entre eles o malonaldeído. O produto final medido é o malonaldeído (MDA) ou substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS (SHARMA & AGARWAL, 1996; LAPENNA et al., 2001).

2.7. Sondas fluorescentes

A integridade da membrana espermática é essencial para o funcionamento celular, exercendo uma função importante na sobrevivência do espermatozóide no aparelho genital da fêmea (SALAMON & MAXWELL, 2000)

e permitindo o processo de fertilização (MALMGREN, 1997; NEILD et al., 1999).

Holt e North (1984), Ollero et al. (1998) e Watson (2000) referiram que as alterações morfológicas da membrana dos espermatozóides ovinos são provocadas pela desorganização dos lipídios, que ocorre durante a fase de refrigeração entre as temperaturas de 30°C e 0°C, estando associadas às mudanças na permeabilidade e na indução da fusão da membrana (HOLT e NORTH, 1986), podendo prejudicar a função das proteínas de membrana que são necessárias à integridade estrutural celular ou ao metabolismo iônico, resultando em uma baixa viabilidade espermática (OEHNINGER et al., 2000).

As técnicas de coloração empregando-se fluorocromos têm fornecido novas maneiras de se avaliar a capacidade funcional dos espermatozóides. Nem todos os corantes supravitais, também conhecidos como coloração de vivos e mortos, são eficientes para a avaliação das amostras de sêmen congelado, diminuindo a acurácia do resultado (GARNER et al., 1986). As sondas fluorescentes sozinhas ou em associações têm sido empregadas na avaliação da funcionalidade das organelas dos espermatozóides e seus compartimentos, principalmente da integridade das membranas espermáticas (MALMGREN, 1997; NEILD et al., 1999; CELEGHINI, 2005).

Garner et al. (1986) em avaliação quantitativa realizada através de citometria de fluxo, utilizaram a combinação duas sondas fluorescentes como método de avaliação da célula espermática; o diacetato de carboxifluoresceína (DIC), por possuir baixo peso molecular passa pela membrana plasmática celular, sendo hidrolisado por esterases, resultando em carboxifluoresceína livre, que permanece retida no interior da célula caso a membrana plasmática esteja íntegra, fluorescendo em verde pela excitação ultravioleta (UV). O DIC é utilizado em combinação com o iodeto de propídio (IP), sonda fluorescente de alta intensidade, que não penetra na célula com membrana plasmática íntegra e quando a membrana está lesada a sonda liga-se ao DNA do espermatozóide, fluorescendo o núcleo em vermelho, quando da excitação UV.

Harrison e Vickers (1990) utilizaram a microscopia de epifluorescência para realizar a avaliação da integridade da membrana em espermatozóides de ovinos e suínos com as sondas fluorescentes DIC e IP em preparação úmida com baixas concentrações de formaldeído. Para cada 100 espermatozóides de

suínos contados, $76,5 \pm 5,5$ foram classificados como intactos pela utilização do DIC isoladamente, $80,3 \pm 5,7$ foram tidos como intactos utilizando apenas IP e $78,3 \pm 4,6$ pela combinação das duas sondas em associação. O mesmo foi realizado com amostras de espermatozóides de ovinos, com resultados semelhantes, indicando a repetibilidade da técnica. Com base nesses resultados os autores propuseram a classificação de espermatozóides íntegros (fluorescendo em verde pelo DIC e não fluorescendo pelo IP) e lesados (parcialmente ou não fluorescendo em verde pelo DIC e fluorescendo em vermelho pelo IP).

O acrossomo é preenchido com substâncias hidrolíticas, organizadas em uma matriz enzimática, e a maioria delas são glicolisadas. A ligação do espermatozóide com a zona pelúcida têm como objetivo a reação acrossomal, resultando na liberação e ativação das enzimas acrossomais (SILVA & GADELLA, 2006).

A reação acrossomal, associada com a hiperativação, ajuda na penetração do espermatozóide na zona pelúcida e sua fusão com a membrana plasmática do oócito. A integridade acrossomal, bem como a manutenção de suas enzimas, são muito importantes para que ocorra a fertilização (CELEGHINI, 2005; SILVA & GADELLA, 2006).

As lectinas conjugadas a fluoresceína são utilizadas em diferentes técnicas para verificar a integridade acrossomal. As lectinas ligam-se a porções específicas de carboidratos das glicoproteínas que estão exclusivamente localizadas no acrossomo. As lectinas conjugadas mais utilizadas são a aglutinina *Pisum sativum* (PSA), aglutinina *Ricinus communis* (RCA), a aglutinina *Arachis hypogea* (PNA), a aglutinina *Triticum vulgaris* (WGA) e a *Conconavalina ensiformis* (ConA) (VALCARCEL et al., 1997; GILLAN et al., 2005).

Para a visualização do acrossomo espermático em microscopia de epifluorescência e leitura em citometria de fluxo, as aglutininas devem ser conjugadas a fluoresceínas, como o isotiocionatode fluoresceína (FITC) (GILLAN et al., 2005; SILVA & GADELLA, 2006).

Uma das aglutininas conjugadas às fluoresceínas mais empregadas é a *Pisum sativum* (PSA). A aglutinina PSA é oriunda da ervilha, liga-se aos

glicoconjugados da matriz acrossomal, tendo afinidade com as terminações α -D-glicosil e resíduos α -D-manosil de glicoproteínas, ligando-se especificamente ao açúcar α -manosidase localizado no conteúdo acrossomal. A PSA conjugada com o FITC realiza uma marcação evidente com o acrossomo espermático fluorescendo em verde amarelado, facilitando a visualização e a identificação dos acrossomos, onde a ausência da fluorescência é indicativo de integridade, e a fluorescência evidencia reação acrossomal e/ou lesão (CELEGHINI, 2005; SILVA & GADELLA, 2006)

2.8. Citometria de fluxo

A adaptação da citometria de fluxo para a avaliação da célula espermática iniciou-se com a finalidade de mensurar seu conteúdo em DNA (EVENSON et al., 1980 *apud* GILLAN et al., 2005), mas, logo sua aplicação estendeu-se a análise dos diversos compartimentos da célula espermática, ampliando-se gradativamente nos últimos anos. Com a evolução das técnicas e aplicações das sondas fluorescentes, a citometria de fluxo é agora empregada na avaliação do sêmen quanto à viabilidade celular, integridade acrossomal, função mitocondrial, capacitação espermática, fluidez de membrana e quantificação e integridade do DNA (GILLAN et al., 2005).

A citometria de fluxo permite a avaliação do tamanho e formato celular, de suas características físicas, bem como da função, complexidade interna e de alguns componentes do espermatozóide relacionados ao comportamento dos fluorocromos. A análise é objetiva, e tem um alto nível de repetibilidade experimental com a vantagem de permitir-se trabalhar com pequena amostras de células. O citômetro também tem a capacidade de detectar vários fluorocromos associados e classificar ao mesmo tempo as características físicas do espermatozóide. Esta particularidade tem trazido vários benefícios à análise espermática, permitindo estudar alguns parâmetros que se relacionam significativamente com a fertilidade *in vivo*, possibilitando ainda testar-se um maior número de parâmetros, aumentando a acurácia em se prognosticar a fertilidade (LARSSON & RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2000).

A avaliação do sêmen por citometria de fluxo apresenta como vantagem o fato de que um grande número de espermatozóides pode ser analisado em um pequeno espaço de tempo, usualmente em torno de 8.000 a 20.000 células por segundo. Quando comparada com método de análise por microscopia de epifluorescência, em que 100 a 200 células são analisadas, a análise por citometria de fluxo demonstra mais precisão e acurácia, uma vez que os resultados são obtidos levando-se em conta 10.000 células (GILLAN et al., 2005).

A despeito dos méritos que a técnica de microscopia de epifluorescência apresenta quando da análise espermática em que se emprega fluorocromos existem alguns pontos que podem ser considerados críticos: baixa repetibilidade na montagem da lâmina, grande probabilidade da avaliação de uma única subpopulação de espermatozóides, tempo despendido entre as leituras, tendo como consequência heterogeneidade qualitativa dos fluorocromos utilizados na amostra, qualificação do operador e subjetividade devido a atributos individuais do espermatozóide (GILLAN et al., 2005).

3. HIPÓTESE

A redução da concentração de gema de ovo no meio Glicina-Gema-Leite associada à suplementação com antioxidante implicará em e incremento qualitativo do sêmen ovino criopreservado.

4. OBJETIVOS

Testar as implicações da redução na proporção de gema de ovo do diluidor Glicina-Gema-Leite sobre a cinética, morfologia e integridade das membranas espermáticas no sêmen ovino criopreservado;

Avaliar a interação da redução na concentração de gema de ovo do diluidor Glicina-Gema-Leite e a suplementação com antioxidantes, Trolox[®], Catalase ou Glutathione, sobre a cinética, morfologia e integridade das membranas espermáticas e peroxidação lipídica no sêmen ovino criopreservado.

5. EXPERIMENTO 1

EFEITOS DA REDUÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE GEMA DE OVO NO MEIO GLICINA-GEMA-LEITE SOBRE A CINÉTICA, MORFOLOGIA E INTEGRIDADE DE MEMBRANAS ESPERMÁTICAS EM SÊMEN OVINO CRIOPRESERVADO

5.1. MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1. Local do experimento

Os procedimentos foram conduzidos no Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Laboratório do Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN), instalações do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) situados no município de Botucatu, Estado de São Paulo (latitude 22° 53'S, longitude 48° 29' W).

5.1.2. Carneiros

Foram utilizados, 4 carneiros da raça Santa Inês pertencentes ao próprio laboratório e 4 carneiros da raça Dorper provenientes de um criatório da região de Botucatu – SP, com idade entre 10 a 84 meses, com pesos entre 60 a 110kg e constada a aptidão reprodutiva pelo exame clínico-andrológico conforme proposto por Fonseca et al. (1992). Durante o período experimental de maio a outubro de 2009, os reprodutores foram mantidos em baias individuais nas dependências do Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos, com alimentação a base de feno de “coast-cross”, concentrado para a manutenção de reprodutores ovino com 16% de proteína bruta (PB) e 85% de nutrientes digestíveis totais (NDT) e livre acesso à água e sal mineral.

5.1.3. Colheita do sêmen

O sêmen foi colhido pelo método de vagina artificial a temperatura de 42°C com copo coletor graduado pré-aquecido à 37°C, com auxílio de uma fêmea contida. De cada reprodutor foi coletado 4 ejaculados a cada 2 a 3 dias, totalizando 32 colheitas.

5.1.4. Avaliação do sêmen

Após cada colheita o sêmen foi avaliado quanto ao aspecto e o volume através da graduação do copo coletor e mantido em banho-maria a 32°C. Dez microlitros (μL) foram diluídos em quatro mililitros (mL) de água destilada com taxa de diluição 1:400, para a realização da concentração espermática em câmara de Neubauer.

Em seguida, uma alíquota do sêmen a fresco (M-1) foi diluída em 100 μL de X-Cell^{®1}, mantendo uma concentração final de aproximadamente 48×10^6 espermatozóides/mL (DAVIS et al., 1992) em seguida 6 μL do sêmen diluído foram transferidos para câmara de Makler² aquecida a 37°C e submetida à análise computadorizada da cinética espermática³, onde foram avaliados em três campos selecionados aleatoriamente, os seguintes parâmetros:

- **MT** - motilidade total (%)
- **MP** - motilidade progressiva (%);
- **VAP** - Velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$);
- **VSL** - Velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$);
- **VCL** - velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$);
- **ALH** - Amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm);
- **BCF** - Frequência de batimentos do flagelo (Hz);
- **STR** - Retilinearidade (%);
- **LIN** - linearidade (%).

¹ X-Cell[®] – IMV, France

² Makler Counting Chamber – Sefi-Medical, Haifa, Israel

³ Hamilton Thorn Motility Analyser - HTMA – IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA

5.1.5. Análise de Integridade total das membranas espermáticas

Para a análise da integridade total das membranas espermáticas (IMB) a fresco (M-1), pós-refrigeração (M-2) e pós-descongelção (M-3), foi preparada uma solução de trabalho adicionando a cada mililitros (mL) de solução salina, 20 μ L de formaldeído, 20 μ L de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e 10 μ L de iodeto de propídio (IP) (Anexo I). Para realizar a análise, 50 μ L da solução de trabalho foi depositado em microtubos de fundo cônico de polipropileno⁴ de 1,5 mL, em seguida foi acrescida uma alíquota de sêmen, ficando com uma concentração final de 10⁷ espermatozóide/mL. Depois de incubado por no mínimo 8 minutos à temperatura de 30°C, 5 μ L dessa suspensão era depositado entre lâmina e lamínula e observado em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência⁵ com filtro de excitação (BP) 450-490nm, espelho dicromático 510nm e filtro de supressão (LP) 515nm (HARRISON e VICKERS, 1990), onde 100 células/lâmina foram avaliadas e distribuídas percentualmente (%) nas seguintes classificações:

- **Íntegros** - acúmulo de DIC (fluorescência verde) ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de IP (fluorescência vermelha);
- **Lesados** - acúmulo de IP ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de DIC, acúmulo de DIC na peça intermediária e acúmulo de IP na cabeça unicamente e acúmulo de fluorescência amarelada na região acrossomal; acúmulo de IP na cabeça e de DIC na peça intermediária.

5.1.6. Análise da Morfologia Espermática

Para a análise da morfologia espermática, 10 μ L de sêmen foram diluídos em 500 μ L de solução de Glutaraldeído à 0,2% (Anexo I). As amostras foram acondicionadas em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL e estocadas à temperatura entre 4 a 5°C para posterior leitura. Para a análise foi utilizada a microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x sob imersão através de preparações úmidas, colocando-se uma gota entre lâmina e

⁴ Axygen Scientific, Union City, USA

⁵ Leica DM LB, Germany

lamínula e classificando-se 100 células por preparação, de acordo com Blom (1973). Nas análises dos dados, enfocaram-se espermatozóides com integridade de acrossomo (ACROS, %) e aqueles com cauda dobrada (CAUDA, %).

5.1.7. Processamento do sêmen

Após as avaliações do ejaculado, o sêmen foi dividido em quatro tratamentos tendo como base o diluïdor GGL (GONZALEZ, 1996 – Anexo I):

- **GGL20** – GGL com 20% de gema de ovo (Osmolaridade: 277mOsm e pH: 7,01);
- **GGL15** – GGL com 15% de gema de ovo (Osmolaridade: 287mOsm e pH: 7,01);
- **GGL10** – GGL com 10% de gema de ovo (Osmolaridade: 279mOsm e pH: 7,11);
- **GGL5** – GGL com 5% de gema de ovo (Osmolaridade: 288mOsm e pH: 7,20).

As diluições foram feitas em duas etapas em temperatura de 32°C: primeiramente a fração um (não glicerolizada) e em seguida a fração dois (glicerolizada). O sêmen diluído foi envasado palhetas⁶ de 0,25 mL na concentração final de 100 x 10⁶ espermatozóides totais/doses. Em seguida, as palhetas eram colocadas no Sistema Automatizado de Refrigeração e Congelação⁷, composto pela unidade de refrigeração, o porta-palhetas e a caixa térmica plástica, recipiente para o nitrogênio líquido. Para a refrigeração com controle automatizado, foi selecionado o programa “P3.S2”, com característica de queda na temperatura na razão de 0,5°C/minuto. O porta-palhetas, previamente aquecido a 32°C, era acoplado à unidade de resfriamento, ficando na posição vertical por 90 minutos até a temperatura final de 5°C. Após este período, realizava-se a congelação com controle automatizado. O porta-palhetas era transferido para a caixa térmica plástica contendo dois litros de nitrogênio líquido, e iniciava-se a curva de congelação

⁶ IMV, France

⁷ TK 3000®, TK Congelações, Brasil

que consistia na queda de temperatura em duas fases, a primeira, na razão de 15°C/min, de 5°C positivos até 80°C negativos e a segunda a 10°C/min de 80°C negativos até atingir-se 120°C negativos, totalizando cerca de nove minutos e 30 segundos de processamento. Com o fim da congelação, as palhetas eram retiradas do porta-palhetas e submersas em nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico até realização das análises, descritos no item 5.1.4..

5.1.8. Descongelação do sêmen

Uma palheta de cada tratamento foi descongelada em banho-maria a 40°C por 20 segundos. O conteúdo das palhetas foi transferido para os microtubos de fundo cônico, mantidos aquecidos a 37°C, sendo as amostras utilizadas para a realização dos testes *in vitro*, momento 3 (M-3), descritos nos itens 5.1.4., 5.1.5., 5.1.6..

5.1.9. Delineamento experimental

O sêmen foi submetido a quatro tratamentos, a saber: GGL com 20% de gema de ovo (**GGL20**), GGL com 15% de gema de ovo (**GGL15**), GGL com 10% de gema de ovo (**GGL10**) e GGL com 5% (**GGL5**) de gema de (Figura 1).

FIGURA 1: Fluxograma experimental do processamento do sêmen submetido aos tratamentos com GGL com 20% de gema de ovo (GGL20), GGL com 15% de gema de ovo (GGL15), GGL com 10% de gema de ovo (GGL10) e GGL com 5% de gema de ovo (GGL5).

5.1.10. Análise estatística

Como havia interesse em se comparar os tratamentos, os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com quatro tratamentos (GGL20, GGL15, GGL10 e GGL5) e 8 blocos (carneiros). Para a análise dos dados utilizaram-se as médias dos valores obtidos das quatro amostras. Como as variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5% (FISHER & BELLE, 1993). Foi utilizado o programa Biostat[®] versão 5.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resumos das análises de variância da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado, morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas do sêmen ovino refrigerado e congelado dos tratamentos GGL20, GGL15, GGL10 e GGL5 são apresentados no Anexo II.

Sobre alguns dos parâmetros estudados foi constatado efeito individual dos carneiros que persistiu ao se agrupar os animais quanto à raça (Anexo II, Tabelas 8 a 11). Entretanto, dada a diversidade no padrão e pequena magnitude das diferenças individuais e raciais, este efeito não foi considerado na comparação entre os tratamentos.

Os resultados da refrigeração e pós-descongelação do sêmen ovino frente aos tratamentos GGL20, GGL15, GGL10 e GGL5 são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

A preocupação sobre o uso da gema de ovo nos meios diluidores tem sido debatida dentro dos centros de processamento de material genético de bovino e ovino, e nos últimos anos, vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de reduzir ou substituir a gema de ovo (BOUSSEAU et al., 1998; GIL et al., 2000). Por questões sanitárias debate-se o uso da gema de ovo nos meios de congelação, devido ao risco de contaminação bacteriana e por micoplasmas, introduzindo doenças exóticas e a produção de endotoxinas, que altera a estrutura da cromatina, prejudicando a capacidade fertilizante dos espermatozóides (BOUSSEAU et al., 1998; THIBIER & GUERIN, 2000).

A gema de ovo é um componente comum na composição da maioria dos meios diluidores, protegendo as células espermáticas contra o choque térmico e osmótico durante o processo de criopreservação (MAXWELL & SALAMON, 1993; MAXWELL & WATSON, 1996; SALAMON & MAXWELL, 2000; BARBAS & MASCARENHAS, 2009).

Numerosos estudos têm demonstrado que existe uma grande variação na composição da gema de ovo quanto aos níveis de ácidos graxos, fosfolipídios e colesterol, devido à linhagem das galinhas, idade do ovo e nutrição das aves, resultando em diferenças na criopreservação (SU et al., 2008).

Comparando-se os tratamentos, a média da motilidade total (MT) dos meios GGL20 (85,5%), GGL15 (89,7%) e GGL10 (90,8%) não diferiram entre si

($P>0,05\%$), o mesmo aconteceu entre GGL20 e GGL5 (71,75) ($P>0,05\%$). Na motilidade progressiva o GGL5 (45,3%) foi menor ($P<0,05$) do que os diluidores GGL20 (58,0%), GGL15 (64,3%) e GGL10 (64,2%). Após a refrigeração a 5°C (Tabela 1).

Na refrigeração, os espermatozóides submetidos à variação de temperatura, principalmente entre 30 e 0°C, sofrem uma perda prematura da motilidade e redução da produção de energia (WATSON, 2000; MEDEIROS et al., 2002).

Gil et al. (2003), comparando o efeito sobre os parâmetros espermáticos durante a refrigeração a 5°C, entre um meio a base de leite contendo 5% (M5), 10% (M10), 15% (M15) e 20% (M20) de gema de ovo, glicerolizado a 15°C com um meio comercial (Bioexcell® - IMV, L'Aigle, França), observaram que não houve diferença significativa no aumento da concentração de gema de ovo acima de 10%, nas motilidades total/progressiva (M5 – 82/66%, M10 – 81/62%, M15 – 84/61% e M20 – 82/61%).

Jones e Martin (1973) relataram que a inclusão de baixa porcentagem de gema de ovo (3%) no diluente fosfato-glicose, já é capaz de reduzir a frequência de lesões de acrossomo e peça intermediária em espermatozóide ovino estocado a 5°C durante 72 horas.

Em relação às velocidades espermáticas, o GGL20 apresentou menores valores ($P<0,05$) de VAP (107,2 $\mu\text{m/s}$) e VCL (151,0 $\mu\text{m/s}$) comparado com os meios GGL15, GGL10 e GGL5 (Tabela 1), este efeito pode estar relacionado com a viscosidade do meio e presença de debris dificultando o deslocamento dos espermatozóides (FARREL et al., 1998).

Sousa (2002), avaliando o desempenho do container Equitainer®, sistema de refrigeração e transporte, no sêmen de ovino utilizando o meio GGL com 20 % de gema de ovo, obteve valores superiores de VCL (219,9 $\mu\text{m/s}$) após 24 horas de refrigeração com relação o VCL neste experimento.

O diluidor GGL20 obteve menor valor ($P<0,01$) de ALH (4,5 μm) comparado com GGL15 (5,0 μm), GGL10 (5,3 μm) e GGL5 (5,6 μm) (Tabela 1).

A frequência do batimento flagelar (BCF) teve os seguintes resultados: os meios GGL10 (44,1Hz), GGL15 (42,8Hz) e GGL5 (42,4Hz), porem, o meio GGL20 (40,7Hz) foi igual ao GGL15 e GGL5 (Tabela 1).

Os valores de retilinearidade (STR) são uma comparação da linha reta com a média das trajetórias, onde fornecem uma indicação da relação entre o espaço ganho e a trajetória geral do espermatozóide, o GGL5 (82,3%) apresentou o menor valor ($P < 0,05$) de STR em comparação aos demais tratamentos: GGL20 (86,8%), GGL15 (86,2%) e GGL10 (85,0%) (Tabela 1).

Um alto valor de STR mostra que o caminho médio seria próximo do caminho em linha reta e um valor baixo indica o caminho médio mais curvilíneo (MORTIMER, 1997). Com base nesta definição podemos concluir que o GGL5 foi menos retilíneo do que os demais tratamentos, porém não podemos dizer que foi o pior, porque não temos valores máximo e mínimo para classificar os espermatozoides ovinos.

A linearidade (LIN) é uma comparação da linha reta com as trajetórias curvilíneas. No GGL10 (57,2%) e o GGL5 (56,0%) foram menores que o GGL20 (64,4%) (Tabela 1).

Uma trajetória circular teria uma baixa LIN, o caminho curvilíneo seria muito maior do que o espaço ganho e uma alta LIN na trajetória indica que o espermatozóide tem o seu movimento mais próximo de uma reta (MORTIMER, 1997). No presente estudo, os espermatozoides refrigerados nos diluidores GGL10 e o GGL5 foram menos linear em seu percurso comparado com o GGL20.

Dessa forma, a gema de ovo atua na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolípidios e, aparentemente, induzindo alteração transitória de sua composição, prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTARD, 1996). Os fosfolípidios que compõe a fração das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo protegem o sêmen, especificamente durante o processo de refrigeração a 5 °C (MEDEIROS et al., 2002; MOUSSA et al., 2002).

TABELA 1: Médias $\pm$ erro padrão dos parâmetros da cinética espermática avaliados no sistema computadorizado, morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas do sêmen ovino refrigerado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).

PARÂMETROS	DILUIDORES			
	GGL20	GGL15	GGL10	GGL5
MT (%)	85,5 $\pm$ 1,1 ^{ab}	89,7 $\pm$ 1,0 ^a	90,8 $\pm$ 1,1 ^{Aa}	71,7 $\pm$ 3,5 ^{Bb}
MP (%)	58,0 $\pm$ 2,2 ^a	64,3 $\pm$ 2,1 ^{Aa}	64,9 $\pm$ 2,0 ^{Aa}	45,3 $\pm$ 3,1 ^{Bb}
VAP (μ m/s)	107,2 $\pm$ 4,4 ^b	114,8 $\pm$ 4,8 ^a	115,4 $\pm$ 4,0 ^a	114,6 $\pm$ 4,2 ^a
VSL (μ m/s)	94,9 $\pm$ 4,0	100,2 $\pm$ 4,1	99,6 $\pm$ 3,4	98,9 $\pm$ 4,5
VCL (μ m/s)	151,0 $\pm$ 7,4 ^{Bb}	168,5 $\pm$ 8,8 ^a	177,2 $\pm$ 8,2 ^{Aa}	172,8 $\pm$ 4,3 ^a
ALH (μ m)	4,5 $\pm$ 0,2 ^{Cc}	5,0 $\pm$ 0,2 ^{Bb}	5,3 $\pm$ 0,2 ^{ABab}	5,6 $\pm$ 0,1 ^{Aa}
BCF (Hz)	40,7 $\pm$ 0,6 ^{Bb}	42,8 $\pm$ 0,5 ^{ab}	44,1 $\pm$ 0,5 ^{Aa}	42,4 $\pm$ 0,6 ^{ab}
STR (%)	86,8 $\pm$ 1,0 ^{Aa}	86,2 $\pm$ 0,7 ^{Aa}	85,0 $\pm$ 0,8 ^a	82,3 $\pm$ 1,0 ^{Bb}
LIN (%)	64,4 $\pm$ 1,3 ^{Aa}	61,0 $\pm$ 1,2 ^{ab}	57,2 $\pm$ 1,3 ^{BCb}	56,0 $\pm$ 1,5 ^{Bc}
ACROS (%)	88,6 $\pm$ 0,5	88,4 $\pm$ 0,5	89,3 $\pm$ 0,2	89,5 $\pm$ 0,3
CAUDA (%)	6,3 $\pm$ 0,6	6,3 $\pm$ 0,7	5,3 $\pm$ 0,4	5,8 $\pm$ 0,5
IMB (%)	67,2 $\pm$ 1,8 ^a	67,3 $\pm$ 1,3 ^a	69,0 $\pm$ 1,3 ^{Aa}	58,3 $\pm$ 2,3 ^{Bb}

Média seguida de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,01$ pelo teste de Tukey.

Média seguida de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

- **Análise computadorizada (CASA)** – MT – Percentual de motilidade total; MP – Percentual de motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva; VCL – Velocidade curvilínea; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilinearidade; LIN – Linearidade.
- **Morfologia espermática** – Acros – acrossomos íntegros e Cauda – caudas dobradas.
- **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente

Verificou-se que a integridade total das membranas espermáticas no meio GGL5 durante a refrigeração, apresentou uma queda significativa ($P < 0,05$).

Os resultados de integridade de membrana observados por Gil et al. (2003), foram menores em meio a base de leite contendo 10% (67%), 15% (63%) e 20% (61%) de gema de ovo, comprado com o GGL10 (69,0%), GGL15 (67,3%) e GGL20 (67,2%), somente o GGL5 (58,3%) foi menor que o meio a base de leite com 5% (63%).

Após a descongelação a MT e MP nos tratamentos com 10% (52,2%) e 5% (58,5%) de gema de ovo foram superiores ao GGL20 (40,5%) (Tabela 2, $P < 0,05$).

O fato de se realizar a redução da gema de ovo, também não interferiu nas motilidades total e progressiva no experimento de Gil et al. (2003), utilizando um meio a base de leite contendo 5% , 10% , 15% e 20% de gema de ovo.

Marco-Jimenez et al (2004), compararam a utilização de gema de ovo em pó e gema de ovo fresca com 10%, 15% e 20% em meio TRIS, observaram que, entre as concentrações 10% (65%), 15% (62%) e 20% (65%) de gema de ovo fresca não houve diferença, mas o TRIS com a gema de ovo em pó foi superior (69%).

Os resultados das velocidades espermáticas realizadas pelo CASA, estão apresentadas da Tabela 2. A VAP dos espermatozóides criopreservados em GGL15 (113,2 μ m/s), GGL10 (115,0 μ m/s) e GGL5 (117,7 μ m/s) foram significativamente maiores que o GGL20 (105,7 μ m/s) ($P < 0,05$). Quanto ao VSL, o GGL5 (102,2 μ m/s) foi maior que o GGL20 (91,9 μ m/s) ($P < 0,01$), enquanto que o GGL15 (99,6 μ m/s) e o GGL10 (99,9 μ m/s) não diferiram do GGL20 e nem do GGL5. Já na VCL, os diluidores GGL10 (191,3 μ m/s) e GGL5 (200,7 μ m/s) foram melhores do que o GGL20 (156,5 μ m/s) e GGL15 (171,8 μ m/s) ($P < 0,01$).

Quanto ao comportamento das velocidades, de um modo geral, observou-se que diminuído-se as concentrações de gema de ovo, as velocidades foram aumentando, estas características podem estar ligadas com a glicina e frutose. No preparo dos meios (Anexo I), devido a redução na concentração da gema de ovo, foi preciso aumentar as quantidades de alguns ingredientes, entre eles a glicina e frutose. Segundo Aisen et al. (1990), a glicina fornece uma maior quantidade de substrato energético para a movimentação espermática, que é sintetizado a partir da serina podendo ser degradado à piruvato, gerando 2ATP.

TABELA 2: Médias $\pm$ erro padrão dos parâmetros da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado, morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas pós-descongelação do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).

PARÂMETROS	DILUIDORES			
	GGL20	GGL15	GGL10	GGL5
MT (%)	40,5 $\pm$ 3,0 ^{Bc}	47,7 $\pm$ 2,3 ^{bc}	52,2 $\pm$ 2,9 ^{ab}	58,5 $\pm$ 2,3 ^{Aa}
MP (%)	23,9 $\pm$ 2,6 ^{Bc}	30,7 $\pm$ 2,2 ^{bc}	35,0 $\pm$ 3,0 ^{ab}	40,9 $\pm$ 2,3 ^{Aa}
VAP (μ m/s)	105,7 $\pm$ 5,4 ^{Bb}	113,2 $\pm$ 5,0 ^a	115,0 $\pm$ 5,1 ^{Aa}	117,7 $\pm$ 4,8 ^{Aa}
VSL (μ m/s)	91,9 $\pm$ 5,2 ^{Bb}	99,6 $\pm$ 4,8 ^{ab}	99,9 $\pm$ 4,8 ^{ab}	102,2 $\pm$ 4,6 ^{Aa}
VCL (μ m/s)	156,5 $\pm$ 7,8 ^{Bb}	171,8 $\pm$ 8,8 ^{Bb}	191,3 $\pm$ 10,1 ^{Aa}	200,7 $\pm$ 8,6 ^{Aa}
ALH (μ m)	5,4 $\pm$ 0,2 ^{Cb}	5,4 $\pm$ 0,2 ^{BCb}	6,2 $\pm$ 0,2 ^{ABa}	6,3 $\pm$ 0,2 ^{Aa}
BCF (Hz)	41,0 $\pm$ 0,7 ^{Cc}	43,3 $\pm$ 0,8 ^{BCbc}	44,7 $\pm$ 0,8 ^{ABbc}	46,5 $\pm$ 0,6 ^{Aa}
STR (%)	82,8 $\pm$ 1,2	83,0 $\pm$ 1,1	82,9 $\pm$ 0,7	83,0 $\pm$ 0,8
LIN (%)	58,5 $\pm$ 1,4 ^{Aa}	56,9 $\pm$ 1,6 ^{ABa}	52,1 $\pm$ 1,1 ^{BCb}	50,2 $\pm$ 1,0 ^{Cb}
ACROS (%)	87,6 $\pm$ 0,5 ^b	86,9 $\pm$ 0,4 ^{ab}	88,1 $\pm$ 0,4 ^{ab}	88,4 $\pm$ 0,4 ^a
CAUDA (%)	6,9 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,2
IMB (%)	34,6 $\pm$ 1,7 ^b	40,6 $\pm$ 1,8 ^{ab}	41,9 $\pm$ 2,1 ^a	42,5 $\pm$ 2,1 ^a

Média seguida de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,01$ pelo teste de Tukey.

Média seguida de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

- **Análise computadorizada (CASA)** – MT – Percentual de motilidade total; MP – Percentual de motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva; VCL – Velocidade curvilínea; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilinearidade; LIN – Linearidade.
- **Morfologia espermática** – Acros – acrossomos íntegros e Cauda – caudas dobradas.
- **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente

O ALH foi maior ($P < 0,05$) nos espermatozóides criopreservados com os meios diluidores GGL10 (6,2 μ m) e GGL5 (6,3 μ m), do que no GGL20 (5,4 μ m) e GGL15 (5,4 μ m) (Tabela 2).

O valor do batimento flagelar (BCF) dos espermatozóides criopreservados, o GGL5 (46,5Hz) foi maior ($P < 0,05$) do que os congelados com GGL20 (41,0%), GGL15 (43,3%) e GGL10 (44,7%), sendo estes iguais entre si (Tabela 2).

A STR não teve diferem significativamente entre os tratamentos. Baseado no que foi discutido na refrigeração, as amostras apresentaram trajetórias semelhantes.

A linearidade foi significativamente maior ($P<0,05$) nos espermatozóides criopreservados nos meios GGL20 (58,4%) e GGL15 (56,9%) do que naqueles criopreservados no GGL10 (52,1%) e GGL5 (50,2%). Relacionando com os resultados da refrigeração o padrão da LIN foram semelhantes, o GGL10 e o GGL5 foram menos lineares em seus percursos comparado com o GGL20 e GGL15 (Tabela 2).

Alguns valores dos parâmetros observados pela CASA têm sido correlacionados com eventos ligados à fertilidade. Em humanos, um padrão de cinética com uma alta motilidade progressiva associado a um movimento lateral de cabeça aumentado, tem sido correlacionado com habilidade de penetrar no muco cervical (AITKEN et al., 1985; MORTIMER et al., 1986). Para Verstegen et al. (2002), o VCL e o VAP predizem resultados no processo de fertilização, visto que, ambos os parâmetros são aumentados após a capacitação espermática. Alguns autores têm investigado os padrões de hiperativação dos espermatozóides de várias espécies, inclusive a ovina, na comparação do comportamento da cinética espermática em diferentes condições *in vivo* e *in vitro* (ROBERTSON et al., 1988; MORTIMER e MAXWELL, 1999; MORTIMER & MAXWELL, 2004).

Em muitos casos, os parâmetros mensurados pela CASA, são subutilizados para estabelecer uma relação entre os efeitos *in vivo* e *in vitro* para avaliar a qualidade do sêmen.

Os espermatozóides apresentaram maior porcentagem ($P<0,05$) de acrossomos íntegros, quando criopreservados com o GGL5 (88,4%) comparado com o GGL20 (87,6%) (Tabela 2).

Após a descongelação, a integridade de membranas foi maior ($P<0,05$) nos espermatozóides criopreservados nos meios diluidores GGL10 (41,9%) e GGL5 (42,5%) do que no GGL20 (34,6%). O aumento na integridade de membranas e integridade acrossomal pode estar relacionada com a proporção de gema de ovo: *Orvus Es Paste* (OEP) contido nos meios, atuando diretamente sobre as membranas espermáticas e na solubilidade dos componentes ativos da gema de ovo. Fato esse não observado no período de

refrigeração, possivelmente devido ao período crítico das alterações morfológicas das membranas dos espermatozóides (HOLT & NORTH, 1984) e alterações críticas resultantes da transição do estado cristalino líquido para a forma de gel (HOLT & NORTH, 1986) (Tabela 2).

Estudos com bovinos (ARIOLA & FOOTE, 1987) e ovinos (MAIA, 2006), demonstraram que a concentração do surfactante lauril sulfato de sódio (OEP) depende da concentração de gema de ovo no meio diluidor.

Ariola e Foote (1987) relataram que a concentração ideal para um meio diluente com 20% de gema de ovo fique entre 0,5 a 1%, fato esse não ocorre com o GGL20 (0,4% de OEP). Provavelmente o aumento da proporção entre gema de ovo e OEP, nos meios GGL10 e GGL5 influenciou nas alterações dos fosfolipídios da gema de ovo e/ou das membranas espermáticas. Segundo El-Alamy e Foote (2001), o OEP pode atuar diretamente nas membranas espermáticas, alterando a sua permeabilidade, ou sobre a gema de ovo, alterando a estrutura dos fosfolipídios, prevenindo contra estresse osmótico.

Oliveira et al. (1988), usando 0,5% de OEP, Akuorki et al. (2004), utilizando 0,7% de Equex-STM e Maia (2006) acrescentando de 0,5 a 1% ao TRIS, obtiveram efeitos benéficos sobre a integridade de membrana plasmática e acrossomal em sêmen de ovino criopreservados.

A preocupação sobre o uso da gema de ovo nos meios diluidores tem sido debatida dentro dos centros de processamento de material genético tanto de bovino quanto de ovino, e nos últimos anos vários estudos tem sido desenvolvidos com o objetivo de reduzir ou substituir a gema de ovo (HINSCH et al., 1997; BOUSSEAU et al., 1998; GIL et al., 2000). A questão sanitária é debate do uso da gema de ovo, devido ao risco de conter bactérias e micoplasmas, gerando o risco de introdução de doenças exóticas e a produção de endotoxinas altera a estrutura da cromatina prejudicando a capacidade fertilizante dos espermatozóides (BOUSSEAU et al., 1998).

Vishwanath e Sannon (2000), apontaram a gema de ovo como uma importante fonte de aminoácidos aromáticos para a formação de radicais livres, principalmente de H_2O_2 , e taxa de formação de ROS teria relação direta com a da concentração de gema de ovo no meio diluente. Entretanto, ao reduzirem a concentração deste componente de 20% para 5% em meio de congelamento, não constataram interferência sobre os índices de fertilidade.

7. EXPERIMENTO 2

EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES TROLOX[®], CATALASE E GLUTATIONA EM MEIO GLICINA-GEMA-LEITE COM 5% DE GEMA DE OVO SOBRE A CINÉTICA ESPERMÁTICA, MORFOLOGIA ESPERMÁTICA, INTEGRIDADE DE MEMBRANAS E LIPOPEROXIDAÇÃO EM SÊMEN OVINO CRIOPRESERVADO.

7.1. MATERIAL E MÉTODOS

7.1.1. Local do experimento

Os procedimentos foram conduzidos no Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Laboratório do Centro de Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN), instalações do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) e no Laboratório de Citometria de Fluxo - Hemocentro de Botucatu – Faculdade de Medicina, da Universidade Estadual Paulista (UNESP) situados no município de Botucatu, Estado de São Paulo (latitude 22° 53'S, longitude 48° 29' W)

7.1.2. Carneiro

Foram utilizados, 5 carneiros da raça Dorper provenientes de um criatório da região de Botucatu – SP, com idade entre 10 a 84 meses, com pesos entre 60 a 110kg e aptidão reprodutiva constatada pelo exame clínico-andrológico conforme proposto por Fonseca et al. (1992). Durante o período experimental de novembro de 2009 a janeiro de 2010, os reprodutores foram mantidos em baias individuais nas dependências do Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos, com alimentação a base de feno de “coast-cross”, concentrado para a manutenção de reprodutores ovino com 16% de proteína bruta (PB) e 85% de nutrientes digestíveis totais (NDT) e livre acesso à água e sal mineral.

7.1.3. Colheita do sêmen

O sêmen foi colhido pelo método da vagina artificial a temperatura de 42°C com copo coletor graduado pré-aquecido à 37°C e com auxílio de uma fêmea contida. Para realizar o processamento dos ejaculados foram necessárias 2 colheitas, com intervalo de 10 minutos, constituindo-se em um “pool” dos dois ejaculados, com o objetivo de obter-se a concentração e o volume necessários para atingir o número de palhetas suficientes para a realização dos testes. De cada reprodutor foram formados quatro “pool” com intervalos de 2 a 3 dias entre eles, totalizando 20 amostras em “pool”.

7.1.4. Avaliação do sêmen

Para as avaliações do sêmen seguiram-se os mesmos critérios do item 5.1.4..

7.1.5. Análise de Integridade total das membranas espermáticas

Para a análise de integridade total das membranas espermáticas (IMB) a fresco (M-1) e pós-refrigeração (M-2), foi seguido o item 5.1.5..

7.1.6. Análise da morfologia espermática

Para a análise da morfologia espermática no sêmen a fresco (M-1), pós-refrigeração (M-2) e pós-descongelção (M-3) segue mesmo critério do item 5.1.6..

7.1.7. Processamento do sêmen

Após as avaliações do ejaculado, o sêmen foi dividido em quatro alíquotas submetidas aos tratamentos:

- **GGL5** – GGL com 5% de gema de ovo (Osmolaridade: 310mOsm e pH: 7,14);
- **GGL5_{TRO}** – GGL5 suplementado com Trolox^{®7}, 100μMol/100 x 10⁶ espermatozóides totais (Osmolaridade: 310mOsm e pH: 7,00);
- **GGL5_{CAT}** – GGL5 suplementado com Catalase⁸, 12,5mg/mL (0,187 U/mL), (Osmolaridade: 305mOsm e pH: 7,09);
- **GGL5_{GSH}** – GGL5 suplementado com Glutathione reduzida⁹, 5mM/100 x 10⁶ espermatozóides totais (Osmolaridade: 307mOsm e pH: 7,11);

As soluções de antioxidantes foram preparadas da seguinte maneira: solução estoque de Trolox[®] a 10mM (0,0125g de Trolox[®] em 5mL de citrato de sódio a 2,94%), solução estoque de Catalase a 12,5mg/mL (0,0125g de Catalase em 1,0mL de citrato de sódio a 2,94%) e solução estoque de Glutathione reduzida a 50mM (0,01536g de Glutathione reduzida em 1,0 mL de citrato de sódio a 2,94%). As soluções estoque de Trolox[®] e Catalase foram aliquotadas em mini tubos e mantidas a -20°C, no momento do processamento do ejaculado as soluções eram descongeladas e mantido a 37°C até o momento da sua adição. A solução de estoque de Glutathione era mantida em mini tubos a 5°C, momentos antes do processamento era mantida a 37°C até o momento da sua adição.

As diluições foram feitas em duas etapas em temperatura de 32°C: primeiramente a fração um (não glicerolizada) e em seguida a fração dois (glicerolizada). O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25 mL na concentração final de 100 x 10⁶ espermatozóides totais/palheta. Os antioxidantes Trolox[®], Catalase e Glutathione eram acrescentados após a fração 2 (glicerolizada). O processo automatizado de refrigeração e congelação seguem o item 5.1.7..

⁷ 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2 carboxylic acid, Aldrich – Cat 23.881-3

⁸ Catalase from bovine liver, SIGMA – C9322

⁹ Glutathione reduced, Sigma-Aldrich – G6013-10G

7.1.8. Descongelação do sêmen

Num primeiro momento uma palheta de cada tratamento GGL5, GGL5_{TRO}, GGL5_{CAT} e GGL5_{GSH} de cada reprodutor foi descongelada em banho-maria a 40°C por 20 segundos, o conteúdo da palheta foi transferido para os microtubos de fundo cônicos mantidos aquecidos a 37°C, sendo as amostras utilizadas para a realização dos testes *in vitro*, momento 3 (M-3), descritos nos itens 5.1.4, 5.1.6. e 7.1.8. Numa segunda etapa duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas para realizar a quantificação da lipoperoxidação no sêmen, conforme item 7.1.9..

7.1.9. Avaliação da integridade da membrana plasmática e a reação acrossomal por citometria de fluxo pós-descongelação

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática e a reação acrossomal por citometria de fluxo (M-3), uma alíquota de 1µL de sêmen foi retirada e adicionada a 100µL de X-Cell[®] em microtubos de fundo cônico de polipropileno de 1,5 mL pré- aquecidos a 37°C. Em seguida foram adicionados a amostra 3µL de iodeto de propídio¹⁰ (0,5mg/mL em solução salina isotônica) e 10µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína¹¹ (FITC-PSA, 100µg/mL) (CELEGHINI et al., 2007). Após 10 minutos de incubação a 37°C, os espermatozóides foram diluídos com a adição de 400µL de um tampão fosfato salino¹² e transferidos para tubos de fundo redondo de poliestireno não estéril de 5mL¹³ e em seguida acoplados ao aparelho de citometria de fluxo FACSCalibur¹⁴. Todas as amostras tiveram 20.000 células analisadas, e os pontos foram gerados pelo *software* CellQuest (Figura 2) após a contagem. A população espermática foi classificada em 4 categorias:

¹⁰ IP, Sigma-Aldrich, 28.707-5

¹¹ FITC-PSA, Sigma, L0770

¹² ISOTON[®], Bayer Health Care, USA

¹³ Becton Dickinson (BD), Cód. 35.2008, USA

¹⁴ Becton Dickinson (BD), USA

- **CAT 1** – membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida;
- **CAT 2** – membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida;
- **CAT 3** – membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida;
- **CAT 4** – membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida.

FIGURA 2. – Gráfico de pontos gerados pela análise de 20.000 células por citometria de fluxo. Amostra impregnadas com a associação dos fluocromos PI e FITC-PSA. **UL** – **CAT 1** - membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida; **UR** – **CAT 2** - membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida; **LL** – **CAT 3** - membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida; **LR** – **CAT 4** - membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida.

7.1.10. Quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática

A peroxidação dos lipídios da membrana plasmática dos espermatozóides foi determinada pelo método espectrofotométrico dos TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), descrito por Buege e Aust (1978), o qual se baseia na quantificação do complexo formado pela reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malonaldeído (MDA), formando um

cromógeno de coloração rósea, o qual é quantificado num comprimento de onda de 532 nm (Anexo I).

Para a determinação dos níveis de lipoperoxidação no sêmen criopreservado, foram descongeladas duas palhetas de sêmen (100×10^6 espermatozóides totais) de cada carneiro e de cada tratamento. A dosagem da concentração de TBARS na amostra de sêmen foi determinada da seguinte maneira: em um tubo de “Falcon” de 15mL depositou-se uma palheta de sêmen com aproximadamente 200 μ L e completado até 500 μ L com tampão TRIS-ácido cítrico (pH: 7, 4, recém-preparado). Em seguida, adicionou-se 1mL de reagente TBA (15% de ácido tricloroacético; 0,25N de ácido clorídrico e 0,375% de ácido tiobarbitúrico) e 1% (v/v) de BHT 50mM, usado para evitar a autooxidação dos lipídios, catalisadas por íons de metais, durante o aquecimento (LAPENNA et al., 2001) com o reagente tiobarbitúrico. Os tubos contendo a mistura foram incubados em banho fervente (100°C) por 15 minutos, em seguida foram resfriados em um recipiente com gelo triturado para parar a reação. Após o resfriamento, as amostras foram centrifugadas 1200xg por 15 minutos. Ao término da centrifugação os sobrenadantes foram retirados e mantidos em gelo triturado até a realização da leitura por espectrofotometria. O ensaio foi realizado em duplicata e com absorbância de 532 nm contra um branco composto por 1mL de reagente de TBA e 0,5mL de tampão TRIS. Todas as amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS¹⁵ a 25°C.

A segunda palheta foi utilizada para induzir a lipoperoxidação. Em um tubo “Falcon” de 15mL depositou-se uma palheta de sêmen com aproximadamente 200 μ L e completou até 500 μ L com tampão TRIS-ácido cítrico, em seguida foi adicionado 0,24mM de sulfato ferroso heptahidratado e 0,5mM de ascorbato de sódio. As amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, adicionou-se a cada amostra 1mL de TBA e 15 μ L de BHT e procedeu-se o mesmo procedimento da mensuração de TBARS na amostra. Este segundo procedimento é conhecido como lipoperoxidação induzida ou catalisada por ferro e ascorbato de sódio e tem por objetivo medir todo o potencial que a amostra teria de gerar o radical em questão, sendo, o controle positivo da reação.

¹⁵ Lambda 25 – Perkin Elmer, USA

A dosagem da concentração de TBARS dos oitos meios diluidores foi determinada diretamente livre de espermatozóides. As amostras dos meios foram descongeladas e uma alíquota de 100 μ L foi utilizada para a determinação da lipoperoxidação dos lipídios da gema de ovo presente no diluidor, seguindo os mesmos passos utilizados para as amostras do sêmen.

Para o cálculo das concentrações de TBARS geradas nas amostras, os resultados obtidos em ambas as amostras (sêmen e meio diluidor) foram comparados com uma curva de calibração feita diariamente com malonaldeído (MDA) como padrão, nas concentrações de 1 a 20 μ mol. Foi preparada uma solução estoque de MDA 10mM pela hidrólise de 17 μ L de malonaldehyde bis (dimetil acetal) em 10mL de HCL 2N por 10 minutos em temperatura ambiente. Para cada 1 mL de reagente TBA era adicionada a quantidade necessária da solução de MDA para resultar em uma concentração final de MDA de 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 e 20nMol/mL. A curva e o branco foram tratados da mesma maneira da amostra.

Os resultados são dados em nMol de TBARS/10⁸ espermatozóides ou nMol de TBARS/mL de diluidor.

7.1.11. Delineamento experimental

O sêmen foi submetido a quatro tratamentos GGL com 5% de gema de ovo (**GGL5**), GGL com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox[®] (**GGL5_{TRO}**), GGL com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (**GGL5_{CAT}**), GGL com 5% de gema de ovo suplementado com Glutathione reduzida (**GGL5_{GSH}**) (Figura 3).

FIGURA 3. Fluxograma experimental do processamento do sêmen submetido aos tratamentos GGL com 5% de gema de ovo (GGL5), GGL com 5% de gema de ovo e Trolox[®] (GGL5_{TRO}), GGL com 5% de gema de ovo e Catalase (GGL5_{CAT}) e GGL com 5% de gema de ovo e Glutathione (GGL5_{GSH}).

7.1.12. Análise estatística

Como havia interesse em se comparar os tratamentos, os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com quatro tratamentos (GGL5, GGL5_{TRO}, GGL5_{CAT} e GGL5_{GSH}) e 5 blocos (carneiros). Foram coletados 4 ejaculados de cada carneiro. Para a análise dos dados utilizaram-se as médias dos valores obtidos das quatro amostras. Como as variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5% (FISHER & BELLE, 1993). Foi aplicado o teste de correlação linear de Pearson, com nível de significância de 5%, entre as categorias de integridade das membranas espermáticas avaliadas por citometria de fluxo e as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). As análises foram realizadas utilizando o programa Biostat[®] versão 5.0.

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados da cinética, morfologia e integridade das membranas espermáticas obtidos no experimento 1, bem como do efeito racial constatado, optou-se em utilizar no experimento 2, o GGL5 como meio base e animais da raça Dorper.

Os resumos das análises de variância da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado, morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas por microscopia de epifluorescência pós-refrigeração e por citometria de fluxo e geração de lipoperoxidação dos tratamentos GGL5, GGL5_{TRO}, GGL5_{CAT} e GGL5_{GSH} são apresentados no Anexo III.

Decorridos 90 minutos de refrigeração os parâmetros de cinética, morfologia e Integridade total de membranas espermáticas no sêmen ovino diluídos nos meios Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo, suplementado com Trolox[®] (GGL5_{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo, suplementado com Catalase (GGL5_{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo, suplementado com Glutathione (GGL5_{GSH}) estão apresentados da tabela 3.

A motilidade total (MT), após a refrigeração a 5°C nos meios diluidores GGL5 (92,4%), GGL5_{TRO} (91,1%) e GGL5_{CAT} (93,3%) não foram semelhantes entre si, e superiores ao GGL5_{TRO} exceto para o GGL5_{GSH} (87,0%) que também foi semelhante ao GGL5_{TRO} (Tabela 3).

A motilidade progressiva (MP) foi maior no GGL5 (78,1%) e semelhante ao GGL5_{CAT} (74,5%), enquanto que no GGL5_{TRO} (72,8%), GGL5_{CAT} e GGL5_{GSH} (72,8%) não diferiram (Tabela 3).

A glutathione (GSH) é utilizada pela glutathione peroxidase como um redutor de peróxido de hidrogênio em água e lipoperóxidos para álcool de alquila. Bucak et al. (2008) observaram altos níveis de glutathione e glutathione peroxidase em sêmen ovino refrigerado quando suplementado com GSH e glutathione oxidada (GSSG), no entanto, as adições desses antioxidantes ao diluidor levaram a uma queda da motilidade. O mesmo foi encontrado em bovinos (FOOTE et al., 2002).

TABELA 3: Médias $\pm$ erro padrão dos parâmetros da cinética espermática avaliados no sistema computadorizado, morfologia espermática e integridade total das membranas espermáticas no sêmen ovino refrigerado nos meios diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox[®] (GGL5_{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5_{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Glutathione (GGL5_{GSH}).

PARÂMETRO	DILUIDOR			
	GGL5	GGL5 _{TRO}	GGL5 _{CAT}	GGL5 _{GSH}
MT (%)	92,4 $\pm$ 0,9 ^a	91,1 $\pm$ 1,6 ^{ab}	93,2 $\pm$ 1,0 ^{Aa}	87,0 $\pm$ 1,6 ^{Bb}
MP (%)	78,1 $\pm$ 1,8 ^{Aa}	72,8 $\pm$ 2,0 ^{Bb}	74,5 $\pm$ 1,0 ^{ab}	72,8 $\pm$ 1,5 ^{Bb}
VAP (μ m/s)	158,5 $\pm$ 5,2 ^{Aa}	151,3 $\pm$ 5,3 ^a	154,7 $\pm$ 4,5 ^a	140,0 $\pm$ 4,1 ^{Bb}
VSL (μ m/s)	138,6 $\pm$ 5,0 ^{Aa}	130,1 $\pm$ 4,6 ^a	133,9 $\pm$ 3,9 ^a	122,7 $\pm$ 3,7 ^{Bb}
VCL (μ m/s)	266,9 $\pm$ 6,5	261,5 $\pm$ 8,2	265,3 $\pm$ 5,8	254,0 $\pm$ 5,5
ALH (μ m)	7,6 $\pm$ 0,1 ^{Bb}	7,9 $\pm$ 0,1 ^a	7,9 $\pm$ 0,1 ^a	8,2 $\pm$ 0,1 ^{Aa}
BCF (Hz)	46,4 $\pm$ 0,9	45,7 $\pm$ 0,6	47,6 $\pm$ 0,6	45,8 $\pm$ 0,8
STR (%)	86,8 $\pm$ 0,9	85,7 $\pm$ 0,8	85,7 $\pm$ 0,4	88,0 $\pm$ 0,8
LIN (%)	52,4 $\pm$ 0,9	50,1 $\pm$ 1,0	50,7 $\pm$ 1,0	49,8 $\pm$ 0,8
ACROS (%)	91,8 $\pm$ 0,2	92,3 $\pm$ 0,3	91,9 $\pm$ 0,2	91,9 $\pm$ 0,2
CAUDA (%)	4,1 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,2
IMB (%)	67,1 $\pm$ 2,8	70,6 $\pm$ 2,0	67,0 $\pm$ 2,1	64,8 $\pm$ 2,0

Média seguida de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,01$ pelo teste de Tukey.

Média seguida de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

- **Análise computadorizada (CASA)** – MT – Percentual de motilidade total; MP – Percentual de motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva; VCL – Velocidade curvilínea; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilinearidade; LIN – Linearidade.
- **Morfologia espermática** – Acros – acrossomos íntegros e Cauda – caudas dobradas.
- IMB – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente

O axonema e as fibras densas da peça intermediária no espermatozoide são cobertos pelas mitocôndrias que geram energia a partir do ATP armazenado intracelularmente. Alto nível de ROS pode prejudicar a motilidade espermática produzindo danos ao axonema em resultando na diminuição do ATP (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992), no caso, os menores valores de MT

e MP do meio GGL5_{GSH}, comparado com o meio GGL5, poderia estar relacionado a uma baixa atividade antioxidante da GSH.

Gadea et al. (2004) adicionaram 5mM de glutathiona reduzida ao sêmen suíno durante a refrigeração e não obtiveram diferenças significativas em motilidade, integridade de membrana e fertilidade.

Analisando as velocidades pela CASA, a VAP e a VSL do sêmen refrigerado com o meio GGL5_{GSH} (140,0/122,7µm/s) foram menores do que o sêmen refrigerado com os meios GGL5 (158,5/138,6µm/s), GGL5_{TRO} (151,3/130,1µm/s) e GGL5_{CAT} (154,7/133,9µm/s). A VCL dos meios GGL5 (266,9µm/s), GGL5_{TRO} (261,5µm/s), GGL5_{CAT} (265,3µm/s) e GGL5_{GSH} (254,0µm/s) não diferiram entre si (Tabela 3).

A amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH) dos espermatozóides refrigerados com o GGL5 (7,6µm) resultou na menor média ($P<0,05$) comparada com meios GGL5_{TRO} (7,9µm), GGL5_{CAT} (7,9µm) e GGL5_{GSH} (8,2µm).

A frequência de batimento (BCF), a STR e a LIN, não diferiram entre os diluidores GGL5, GGL5_{TRO}, GGL5_{CAT} e GGL5_{GSH} (Tabela 3).

Apesar das mudanças morfológicas na organização e composição dos lipídios e conseqüentemente na fluidez das membranas celulares provocadas pelos efeitos físicos e químicos da criopreservação (HOLT et al., 1992; WATSON, 1995; CELEGHINI, 2005) que podem danificar de forma irreversível a membrana externa do acrossomo, o meio GGL com 5% de gema de ovo e quando suplementado com Trolox[®], Catalase e Glutathiona preservaram a integridade acrossomal.

A integridade total das membranas espermáticas não diferiu estatisticamente entre os tratamentos GGL5 (67,1%), GGL5_{TRO} (70,6%), GGL5_{CAT} (67,0%) e GGL5_{GSH} (64,8%) (Tabela 3).

Os resultados da cinética espermática avaliados no sistema computadorizado, morfologia espermática, integridade das membranas espermática avaliadas por citometria de fluxo e concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico (TBARS), pós-descongelção do sêmen ovino, estão apresentados nas tabelas 4 a 7.

O processo de criopreservação do sêmen resulta em danos ultraestruturais, bioquímica e funcional dos espermatozóides (WATSON, 2000). Alguns fatores que contribuem para a redução da viabilidade espermática incluem a composição do meio diluidor, concentração do crioprotetor e as taxas de queda de temperatura utilizadas na refrigeração, congelamento e descongelamento (SALAMON & MAXWELL, 2000).

As motilidades total (MT) e progressiva (MP) não diferiram significativamente, entre os tratamentos GGL5 (52,5%), GGL5_{TRO} (56,0%), GGL5_{CAT} (54,2%) e GGL5_{GSH} (50,4%) (Tabela 4).

A motilidade é um dos parâmetros da cinética espermática que demonstra a fertilidade do macho, por causa da importância para migração dos espermatozóides no trato reprodutivo da fêmea e para a fertilização e é considerada uma expressão de viabilidade e integridade estrutural do espermatozóide (VERSTEGEN et al., 2002).

O Trolox[®] é um análogo da vitamina E (α -tocoferol), devido a sua solubilidade em água, apresenta potente propriedade antioxidante.

A adição de Trolox[®] (GGL5_{TRO}) não resultou em uma melhora significativa na MT e MP comparada com ao GGL5. Existem vários estudos com diferentes resultados sobre o efeito da adição de Trolox[®] ou vitamina E (Vit. E) no diluente. Em ovinos adicionando Vit. E ao diluente (SARLOS et al., 2002) e em suínos com Trolox[®] (BREININGER et al., 2005), obtiveram melhora na motilidade, enquanto que Uperti et al. (1997) utilizando Vit. E em meio diluente para ovinos e Ball et al. (2001) suplementando o meio com Trolox[®] para eqüinos, não alcançaram um efeito desejado desses antioxidantes sobre a motilidade.

Maia et al. (2009) suplementando o meio TRIS-gema com Trolox[®], obteve melhor porcentagem de motilidade total (65,0%) comparando com o GGL5_{TRO} (56,0%), mas, a motilidade progressiva do GGL5_{TRO} (42,6%) foi melhor do que o TRIS-gema com Trolox[®] (26,0%).

O GGL5_{CAT} também não diferiu do GGL5 quanto à motilidades total e progressiva, com base nisso podemos questionar se a catalase deu a sua contribuição durante o processo de criopreservação. Tendo a função de catalisar a reação que transforma duas moléculas de H₂O₂ em duas de água

(H₂O) em uma de oxigênio (O₂). Marti et al. (2003) descreveram que as concentrações de catalase e glutathione peroxidase no sêmen fresco de ovino são baixas e Bilodeau et al. (2000) após realizarem o processo de criopreservação de sêmen bovino, mensuraram a glutathione peroxidase e a catalase e relataram que a glutathione peroxidase estava presente em pequenas quantidades enquanto que a catalase estava ausente, mostrando que nesses níveis ficava difícil remover o H₂O₂. Se a mesma regra ocorre com os espermatozoides ovinos, a catalase conseguiu proteger os espermatozoides dos efeitos danosos do H₂O₂, preservando a motilidade.

TABELA 4: Médias $\pm$ erro padrão dos parâmetros da cinética espermática avaliados no sistema computadorizado e morfologia espermática pós-descongelamento no sêmen ovino congelado nos meios diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox[®] (GGL5_{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5_{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Glutathione (GGL5_{GSH}).

PARÂMETRO	DILUIDOR			
	GGL5	GGL5 _{TRO}	GGL5 _{CAT}	GGL5 _{GSH}
MT (%)	52,5 $\pm$ 2,7	56,0 $\pm$ 3,3	54,2 $\pm$ 2,8	50,4 $\pm$ 2,3
MP (%)	38,8 $\pm$ 2,3	42,6 $\pm$ 2,7	39,9 $\pm$ 2,3	35,2 $\pm$ 1,5
VAP (μ m/s)	134,2 $\pm$ 4,9	125,3 $\pm$ 4,5	135,5 $\pm$ 5,0	119,5 $\pm$ 4,5
VSL (μ m/s)	117,4 $\pm$ 5,3 ^a	111,0 $\pm$ 4,2 ^a	120,3 $\pm$ 4,9 ^{Aa}	101,8 $\pm$ 4,0 ^{Bb}
VCL (μ m/s)	234,1 $\pm$ 6,1	224,8 $\pm$ 5,7	228,3 $\pm$ 6,9	215,6 $\pm$ 7,4
ALH (μ m)	7,0 $\pm$ 0,1 ^a	7,6 $\pm$ 0,2 ^a	6,9 $\pm$ 0,1 ^b	7,3 $\pm$ 0,3 ^a
BCF (Hz)	47,8 $\pm$ 1,2	48,5 $\pm$ 0,8	48,3 $\pm$ 0,7	46,7 $\pm$ 0,7
STR (%)	85,5 $\pm$ 1,5 ^a	85,0 $\pm$ 1,1 ^a	86,0 $\pm$ 1,1 ^a	82,1 $\pm$ 1,8 ^b
LIN (%)	49,8 $\pm$ 1,6 ^{ab}	47,6 $\pm$ 1,6 ^{Bb}	52,0 $\pm$ 1,5 ^{Aa}	46,8 $\pm$ 1,4 ^{Bb}
ACROS (%)	90,9 $\pm$ 0,3	91,2 $\pm$ 0,2	90,7 $\pm$ 0,2	91,0 $\pm$ 0,2
CAUDA (%)	6,2 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,2	6,1 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 0,2

Média seguida de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,01$ pelo teste de Tukey.

Média seguida de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

- **Análise computadorizada (CASA)** – MT – Percentual de motilidade total; MP – Percentual de motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva; VCL – Velocidade curvilínea; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilinearidade; LIN – Linearidade.
- **Morfologia espermática** – Acros – acrossomos íntegros e Cauda – caudas dobradas.
- **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente

Apesar da Glutathione reduzida ter afetado a motilidade durante a refrigeração em sêmen ovino (BUCAK et al., 2007) e em bovinos (FOOTE et al., 2002), isso não ocorreu neste experimento. O GGL5_{GSH} (50,4%) não diferiu estatisticamente do controle (GGL5, 52,5%) (Tabela 4).

Tendo como controle o GGL5, a velocidade de trajeto (VAP) e a velocidade curvilínea (VCL) não sofreram influência da suplementação dos antioxidantes Trolox[®], Catalase e Glutathione (Tabela 4). Já a velocidade retilínea (VSL) foi menor quando o meio foi suplementado com Glutathione.

No que diz respeito ao ALH (Tabela 4), a adição de catalase ao meio GGL5, resultou em menor amplitude de deslocamento lateral de cabeça (6,9 μ m) em relação aos espermatozóides suplementados com Trolox[®] (7,6 μ m), Glutathione (7,3 μ m) e ao controle (7,0 μ m).

No caso da retilinearidade (STR), os espermatozóides criopreservados no meio contendo glutathione apresentaram menor valor médio (82,1%) quando comparado ao GGL5 (85,5%), GGL5_{TRO} (85,0%) e o GGL5_{CAT} (86,0%) (Tabela 4).

A linearidade no GGL5_{CAT} (52,0%) foi maior do que no GGL5_{TRO} (47,6%) e no GGL5_{GSH} (46,8%) (Tabela 4).

Recentemente, estudos com a análise computadorizada do movimento espermático têm sido conduzidos para determinar os parâmetros que se relacionem com a migração no muco cervical e hiperativação espermática (MORTIMER & MAXWELL, 1999; ROBAYO et al., 2008).

Cox et al. (2006) encontraram que os parâmetros de velocidade e linearidade estão relacionados com a habilidade do espermatozóide de bode em migrar no muco cervical.

A hiperativação é um evento flagelar, que usualmente é definido pelas características de movimento de cabeça ou pela cinética (MORTIMER & MAXWELL, 1999). Os parâmetros usualmente utilizados para definir a hiperatividade pelo CASA são o VCL, VAP, VSL, LIN, STR, ALH e BCF (MORTIMER, 1997). Mortimer e Maxwell (1999), estudando várias trajetórias individuais dos espermatozóides, determinaram valores que definem a hiperativação em espermatozóide ovino: VCL >250,0 μ m/s, VSL $\leq$ 100,0 μ m/s, LIN $\leq$ 30% e ALH > 9,0 μ m.

No caso, a subutilização da CASA é fator relevante, na qual, poderíamos estar detalhando melhor a qualidade do sêmen analisado individualizando os espermatozóides e assim fornecendo informações adicionais sobre as características de movimentação, categorizando as sub-populações espermáticas através de valores definidos.

Os espermatozóides são constituídos por três membranas, a plasmática, a acrossomal e a mitocondrial. Essas membranas devem permanecer intactas, para o funcionamento celular, sendo um importante parâmetro a ser avaliado (MALMGREN, 1997).

A integridade das membranas é fundamental para o processo de fertilização. Através dos resultados obtidos pela citometria de fluxo o percentual de espermatozóides com membrana plasmática íntegra e acrossomo não reagido no GGL5_{CAT} (35,9%) foi semelhante ao GGL5_{TRO} (33,3%) e superior ao GGL5 (30,1%) e GGL5_{GSH} (26,9%) enquanto que os resultados do GGL5_{TRO} e o GGL5 foram iguais estatisticamente (Tabela 5), mostrando que a catalase adicionada ao diluidor conferiu maior proteção aos espermatozóides, em relação ao controle (GGL5).

Aitken et al. (1995) sugere, em espermatozóides humano, que a estimulação da geração da ROS é associada ao aumento da fosforilação de tirosina que é um componente essencial para desencadear a cascata bioquímica da exocitose acrossomal e fusão com oócito. O H₂O₂ está envolvido na fosforilação de tirosina das proteínas durante a capacitação espermática. A catalase inibe a indução da fosforilação de tirosina das proteínas e também remove o H₂O₂, aumentando acrossomos não reagidos.

Maia (2006) utilizando as combinações dos fluocromos IP, FITC-PSA e JC-1 para verificar a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial do espermatozóide ovino congelado, obteve os seguintes resultados para a categoria de membrana plasmática e acrossomal íntegras: 31,6±1,4% em TRIS+Trolox[®], 34,0±1,4% no meio TRIS+Catalase e 28,0±1,4 em TRIS + Trolox[®] + Catalase.

Borges (2008) estudando os efeitos da utilização de antioxidantes no diluidor para criopreservação de sêmen bovino e testando na inseminação artificial e fecundação *in vitro*, obteve pós-descongelação 40,72% de células

integras com o meio TRIS e 42,44% de íntegros com TRIS + Trolox[®] (200 μ M). Na inseminação artificial com estro natural, o índice de prenhez foi de 58,7% com o TRIS e 58,0% com TRIS+ Trolox[®]. Na fecundação *in vitro*, a adição de Trolox[®] no meio de criopreservação de sêmen aumentou a taxa de blastocisto (34,50%), quando comparado com o meio sem o antioxidante (31,70%) ($P < 0,05$).

Maxwell e Stojanov (1996) observaram um efeito benéfico da Catalase sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal em sêmen ovino criopreservado.

Tanno (2009) Estudando as alterações morfo-funcionais de espermatozoides bovino submetidos à sexagem por citometria de fluxo, utilizando IP + FITC-PSA para integridade das membranas plasmática e acrossomal, obteve 25,6% para membranas plasmática e acrossomal íntegras com sêmen criopreservado com meio “Lagoa” e 29,9% de membranas plasmática e acrossomal íntegras com sêmen criopreservado com meio “Sexing”.

TABELA 5: Médias $\pm$ erro padrão, do percentual de células das categorias de integridade das membranas espermática avaliadas por citometria de fluxo pós-descongelamento no sêmen ovino congelado nos meios diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox[®] (GGL5_{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5_{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Glutathione (GGL5_{GSH}).

CATEGORIA	DILUIDOR			
	GGL5	GGL5 _{TRO}	GGL5 _{CAT}	GGL5 _{GSH}
CAT 1	26,4 $\pm$ 2,5	26,6 $\pm$ 2,1	24,1 $\pm$ 2,1	23,6 $\pm$ 2,2
CAT 2	41,2 $\pm$ 3,8 ^b	39,5 $\pm$ 3,6 ^{Bb}	38,9 $\pm$ 2,7 ^{Bb}	48,8 $\pm$ 2,9 ^{Aa}
CAT 3	30,1 $\pm$ 2,8 ^{bc}	33,3 $\pm$ 3,1 ^{Aab}	35,9 $\pm$ 2,3 ^{Aa}	26,9 $\pm$ 2,6 ^{Bc}
CAT 4	2,1 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1

Média seguida de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,01$ pelo teste de Tukey.

Média seguida de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

- **CAT 1** – Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida;
- **CAT 2** – Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida;
- **CAT 3** - Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida;
- **CAT 4** - Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida.

Os níveis de lipoperoxidação espontânea (Tabela 7) observados no presente estudo não influenciaram na porcentagem de membranas plasmática e acrossomal íntegras, quando comparada com o GGL5 (controle), mostrado serem viável a adição da catalase

A quantificação de TBARS dos tratamentos foi feita usando uma curva padrão de MDA (malonaldeído bis dimetil acetal). A curva foi linear até 20nMol/mL e a leitura foi feita na parte linear da curva (Anexo IV).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de ROS. Devido às altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) em suas membranas e ao citoplasma reduzido, os espermatozóides são mais sensíveis aos ROS (HAMMERSTEDT et al., 1990). A peroxidação lipídica dos PUFAs diminuí a fluidez e a flexibilidade da membrana, comprometendo a fertilidade espermática de humanos (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992 e 1995), bovino (BECONI et al., 1991), porco (CEROLINI et al., 2000) e carneiros (JONES & MANN, 1977).

O nível de lipoperoxidação nos meios diluidores GGL5_{CAT} (15,2nmol/mL) e GGL5_{GSH} (15,2nmol/mL) foram semelhante ao GGL5 (15,5nmol/mL), no entanto o GGL5_{TRO} (13,2nmol/mL) gerou menos lipoperoxidação (Tabela 6).

TABELA 6: Médias $\pm$ erro padrão das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico (TBARS) nos meios diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox[®] (GGL5_{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5_{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Glutathione (GGL5_{GSH}). Valores expressos em nmol/mL de meio diluidor.

PARÂMETRO	DILUIDOR			
	GGL5	GGL5 _{TRO}	GGL5 _{CAT}	GGL5 _{GSH}
LPO espontânea	15,5 $\pm$ 0,1 ^{Aa **}	13,2 $\pm$ 0,3 ^{Bb}	15,2 $\pm$ 0,1 ^{Aa **}	15,2 $\pm$ 0,2 ^{Aa}
LPO catalisada	14,1 $\pm$ 0,1 ^b	13,9 $\pm$ 0,2 ^{Bb}	13,4 $\pm$ 0,2 ^{Bb}	15,7 $\pm$ 0,2 ^{Aa}

Média seguida de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,01$ pelo teste de Tukey.

Média seguida de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

* Médias diferentes na mesma coluna diferem entre si a $P < 0,01$ pelo teste de Tukey.

** Médias diferentes na mesma coluna diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey

▪ LPO espontânea – Lipoperoxidação espontânea do meio diluidor.

▪ LPO catalisada – Lipoperoxidação catalisada, contendo meio diluidor + sulfato ferroso + ascorbato de sódio.

Esperava-se que as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico (TBARS) nos meios diluidores fossem baixas devido a porcentagem de gema de ovo utilizada nos meios diluentes.

Maia (2006), medindo a lipoperoxidação nos meios obteve níveis muito baixos no TRIS ($0,49 \pm 0,10$ nmol/mL), TRIS + Trolox[®] ($0,51 \pm 0,10$ nmol/mL), TRIS + Catalase ($0,70 \pm 0,05$ nmol/mL), TRIS + Trolox[®] + Catalase ($0,52 \pm 0,09$ nmol/mL).

Morani (2004) utilizando o TRIS-gema, obteve altos valores na mensuração de TBARS nas diferentes etapas de criopreservação, $19,0772 \pm 1,7774$ nmol/mL na diluição, $19,1625 \pm 1,8219$ nmol/mL na refrigeração, $18,5938 \pm 1,7466$ nmol/mL pós-descongelação – 0 hora e $14,3039 \pm 1,7774$ nmol/mL pós-descongelação – 3 horas.

Apesar da gema de ovo fornecer lipídios para a inicialização da lipoperoxidação, ao mesmo tempo tem propriedades antioxidante independente da suplementação com antioxidante ou não (DESJARDINS & HAFS, 1961).

Comparando os resultados de lipoperoxidação das amostras de sêmen descongeladas (Tabela 7), podemos propor que existe uma interação entre meio diluidor, sêmen (espermatozóides + plasma seminal) e antioxidante para conferir uma proteção contra o estresse oxidativo.

Kankofer et al. (2005), adicionando um diluidor a base de leite desnatado no sêmen de garanhão, observaram um aumento de três enzimas: Glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase, bem como nos níveis de TBARS, comparado ao sêmen sem o diluidor. O aumento indica uma positiva interação entre componentes do diluidor que possivelmente contenham co-fatores e substâncias de adição, a serem esclarecidas, que se associam a componentes e enzimas antioxidantes do plasma seminal para regular a lipoperoxidação dos espermatozóides.

Os níveis de lipoperoxidação espontânea (LPO espontânea) dos tratamentos GGL5, GGL5_{TRO}, GGL5_{CAT} e GGL5_{GSH} pós-descongelação, não tiveram diferença estatística (Tabela 7), demonstrando que a interação meio diluidor + sêmen, meio diluidor + sêmen + antioxidante, foram capazes de inibir a lipoperoxidação excessiva.

TABELA 7: Médias $\pm$ erro padrão das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbiturico (TBARS) pós-descongelamento no sêmen ovino congelado nos meios diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox[®] (GGL5_{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5_{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Glutathione (GGL5_{GSH}). Valores expressos em nmol/10⁸ espermatozoides.

PARÂMETRO	DILUIDOR			
	GGL5	GGL5 _{TRO}	GGL5 _{CAT}	GGL5 _{GSH}
LPO espontânea	3,9 $\pm$ 0,2	3,7 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,1
LPO catalisada	4,9 $\pm$ 0,2 ^{Aa *}	3,5 $\pm$ 0,2 ^{Bb}	4,9 $\pm$ 0,2 ^{Aa *}	4,5 $\pm$ 0,2 ^{Aa **}

Média seguida de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,01$ pelo teste de Tukey.

Média seguida de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

* Médias diferentes na mesma coluna diferem entre si a $P < 0,01$ pelo teste de Tukey.

** Médias diferentes na mesma coluna diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

▪ LPO espontânea – Lipoperoxidação espontânea do sêmen criopreservado

▪ LPO catalisada – Lipoperoxidação catalisada, contendo sêmen criopreservado + sulfato ferroso + ascorbato de sódio.

A inibição da lipoperoxidação foi confirmada quando se adicionou o catalisador sulfato ferroso e ascorbato de sódio ao meio reacional. Nessa situação observou-se o aumento da geração de TBARS nos tratamentos GGL5, GGL5_{CAT} e GGL5_{GSH}, exceto o GGL5_{TRO} (Tabela 7), demonstrando a capacidade do Trolox[®] em inibir o processo de lipoperoxidação. O mecanismo de ação do Trolox[®] é semelhante ao da vitamina E (α -tocoferol), ou seja, ele atua removendo os radicais peroxil, interrompendo a reação em cadeia da lipoperoxidação (ALBERTINI & ABUJA, 1999).

A capacidade de inibição da lipoperoxidação da membrana espermática pela vitamina E já foi comprovada no sêmen congelado de bovino (BECONI et al., 1993), no sêmen de cachoço tanto na forma líquida (CEROLINE et al., 2000) quanto congelada (BREINING et al., 2005). Maia (2006), utilizando Trolox[®] em sêmen ovino criopreservado, observou a mesma capacidade em inibir a lipoperoxidação após a reação catalisada com sulfato ferroso.

Silva et al. (2009), estudando o efeito de Trolox[®] e pentoxifilina sobre os espermatozoides eqüinos, concluíram que adição de 120 μ M/mL de Trolox[®] ao diluente após a descongelamento, preserva a motilidade total e progressiva das células espermáticas incubadas a 37°C durante 120 minutos.

Constatou nível de significância superior a 5% ($P > 0,05$) nos coeficientes de correlação linear obtidos pelo teste de Pearson, entre as categorias de integridade das membranas espermáticas avaliadas por citometria de fluxo e as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Atribuem-se este resultado ao fato de que a avaliação da peroxidação lipídica não é resultante apenas dos efeitos dos radicais oxidativos sobre componentes lipídicos presentes nas células espermáticas, mas também com a contribuição dos efeitos sobre aqueles presentes no plasma seminal e meio diluidor. Entretanto isto não significa uma perda de fidedignidade na utilização da peroxidação lipídica como marcador da geração e efeitos dos ROS sobre o sêmen criopreservado.

9. CONCLUSÕES

Diante das condições experimentais e com base nos dados obtidos, pode-se concluir:

1. A proporção da gema de ovo na formulação do meio diluidor Glicina-Gema-Leite pode ser reduzida, até a concentração de 5% sem implicar em prejuízo dos parâmetros quali-quantitativo do sêmen criopreservado;
2. Os antioxidantes Trolox[®] na concentração de $100\mu\text{M}/100 \times 10^6$ espermatozóides totais e Catalase na concentração de 12,5mg/mL, podem ser adicionados ao meio Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo, por promoverem efeitos benéficos sobre alguns dos parâmetros quali- quantitativos do sêmen ovino criopreservado;
3. A Catalase adicionada ao meio Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo, na concentração de 12,5mg/mL, incrementa a preservação das membranas espermáticas dos espermatozóides submetidos ao processo de congelação;
4. O Trolox[®] adicionado ao meio Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo, na concentração de $100\mu\text{M}/100 \times 10^6$ espermatozóides totais, apresenta efeito protetor ao processo de lipoperoxidação demonstrado pela reação catalisada com sulfato ferroso e ascorbato de sódio;
5. A adição de Glutathione no meio Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo na concentração de 5mM/100 x 10^6 espermatozóides totais, não traz benefícios ao processo de criopreservação do sêmen ovino;
6. Os resultados permitem inferir que existe uma ação integrada entre os espermatozóides, o plasma seminal, e o meio diluidor sobre os níveis de peroxidação lipídica, requerendo novos estudos para confirmação desta hipótese.

10. BIBLIOGRAFIA

ABOAGLA, E. M.-E.; TERADA, T. Effect of the supplementation of trehalose extender contain egg yolk with sodium dodecyl sulfate on freezability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.809-818, 2004.

AISEN, E.G., CISALE, H., FERNANDEZ, H. Criopreservacion de semen ovino. Nueva técnica. **Vet. Argent.**, v.7, p.176-82, 1990.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; HARGREAVE, T. B.; IRVINE, D. S.; WU, F. C. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. **Journal of Andrology**, v. 10, n. 2, p. 214-220, 1989.

AITKEN, R. J.; IRVINE, D. S.; WU, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 164, n. 2, p. 542-551, 1991.

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

AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1037–1046, 1998.

AITKEN, R.J.; BARKER, M. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. . **International Journal of Andrology**. v.25, p.191-194, 2002.

AKOURKI, A.; GIL, L.; ECHEGARAY, A.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; DE BASS, I.; GONZALEZ, N.; GALLEGOS DE LA HOYA, M.; MEQUE, L.C. Effect of the extender supplement Equex-STM on cryopreserved semen in the Assaf sheep. **Cryo Letters**. v.25, n.2, p.147-154, 2004.

ALBERTINI, R.; ABUJA, P.M. Prooxidant and antioxidant proprieties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. **Free Radical Research**, v.30, n.3, p. 181-188, 1999.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L. et al. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl[®], a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v. 61, p. 895-907, 2004.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.

ARIOLA, J.; FOOTE, R.H. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.8, p.1664-1670, 1987.

BAILEY, J.L., BILODEAU, J.F., CORMIER, N. Semen, cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **J. Androl.**, v.21, p.1-6, 2000.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 56, p.577-589, 2001.

BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**. v.10, p.49-62, 2009.

BARCLAY, L.R.C.; ARTZ, J.D.; MOWAT, J.J. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: ^{14}C tracer and product studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1237, p.77-85, 1995.

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

BECONI, M.T.; AFFRANCHINO, M.A.; SCHAND, L.M.; BEORLEGUI, N.B. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**. v.23, n.3, p.545-553, 1991.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular and Reproduction and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, n.3, p.282-288, 2000.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H_2O_2 – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p.275-288, 2001.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord. Veterinaarmed.**, v.25, p.382-391, 1973.

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. 70p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; O'FLAHERTY, C.M.; BECONI, M.T.

Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v.63, n.8, p.2126-2135, 2005

BRENER, E., RUBINSTEIN, S., COHEN, G., SHTERNALL, K., RIVLIN, J., BREITBART, H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. **Biological Reproduction**, v.68, p.837-45, 2003.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v.50, p.699-706, 1998.

BUCAK, M.N.; TEKIN, N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. **Small Ruminant Research**. v.73, p.103-108, 2007a.

BUCAK, M.N.; ATEŞŞAHİN, A.; VARIŞH, Ö.; YÜCE, A.; TEKIN, N.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**. v.67, p.1060-1067, 2007.

BUCAK, M.N.; ATEŞŞAHİN, A.; YÜCE, A. Effect of anti-oxidant and oxidative stress parameters on ram semen after the freezer-thawing process. **Small Ruminant Research**. v.57, p.128-134, 2008.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmn bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondril e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186p Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p. 479-488, 2007.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.99-111, 2000.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.452-458, 2001.

CORTEEL, J.M. L'Insémination artificielle caprine: bases physiologiques, état actuel et perspectives d'avenir. **World Rev. Anim. Prod.**, v.9, p.73-99, 1973.

CORT, W.M.; SCOTT, J.W.; ARAUJO, M.; MERGENS, W.J.; CANNALONGA, M.A.; OSCADA, M.; HARLEY, H. PARRISH, D.R.; POOL, W.R. Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.52, n.6, p.174-178, 1975.

DAVIS, R.O.; ROTHMANN, S.A.; OVERSTREET, M.D. Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. **Fertility and Sterility**, V.57, n.3, p.648-653, 1992.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate (ATP) plays an important role in inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, n. 5, p. 379-386, 1992.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Capacitation-associated production of superoxido anion by human spermatozoa. **Free Radical Biology Medicine**. v.18, n.3, p.487-495, 1995.

DESJARDINS, C.; HAFS, H.D. Enzymatic degradation of hydrogen peroxide in egg yolk. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p. 1183, 1961.

EL-ALAMY, M.A.; FOOTE, R.H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**. v.65, p.245-254, 2001.

ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v.31, n.1, p.17-22, 1999.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Sydney:Butterworths, 1987. 194 p.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWIEZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**. v.210, p1131-1133, 1980.

FARREL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v.49, p.871-879, 1998.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251-260, 1996.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.1-16, 1997.

FISHER, L.D.; BELLE, G.V. **Biostatistics A Methodology for the health Sciences**.Wiley-Interscience, New York, 991p, 1993.

FONSECA, V.O., VALE FILHO, V.R., MIES FILHO, A. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992, 40p.

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

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.49, p.277-284, 1977.

GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A.; COY, P.; MATÁS, 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**. v.62, p.690-701, 2004.

GARNER, D.L., PINKEL, D., JOHNSON, L.A., PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol. Reprod.**, v.34, p.127-138, 1986.

GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M.C. et al. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Tryladil. **Reproduction Domestic Animal**, v.35, p.69 – 77, 2000.

GIL, J., RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M., LUNDEHEIM, N., SÖDERQUIST, L., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.1157-1170, 2003.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow Cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.

GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, p. 81-94, 1998.

GONZALEZ, C.I.M. **Avaliação “in vitro” e “in vivo” de sêmen ovino (*Ovis aries*) congelado em palhetas e “pellets” com diferentes diluidores**. Botucatu, 1996. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (Revisão de literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.28, n.4, p.187-195, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Claredon Press, 1989. 543 p.

HAMMERSTED, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, n.1, p.73-88, 1990.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-52, 1990.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Thermotropic phase transitions in plasma membrane of ram spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.78, p.447-457, 1986.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Partially irreversible cold induce lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze fracture study. **Journal Exp. Zool.**, v.230, p.473-483, 1984.

IRVINE, D.S. Glutathione as a treatment for male infertility. **Review Reproduction**. v.1, p.6-12, 1996.

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

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and Catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**. v.63, p.1354-1365, 2005.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 1217-1227, 1997.

KATKOV, I.I.; KATHOVA, N.; CRITSER, J.K.; MAZUR, P. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol. Chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. **Cryobiology**, v.37, p.325-338, 1998.

KESSOPOULO, E.; TOMLINSON, M.J.; BARRATT, C.L.; BOLTON, A.E.; COOKE, I.D. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? **Journal of Reproduction and Fertility**. v.94, p.463-470, 1994.

KUMAR, S., MILLAR, J.D., WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p.246-253, 2003.

LAPENNA, D.; CIOFANI, G.; PIERDOMENICO, S.D.; GIAMBERARDINO, M.A.; CUCCURULLO, F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid preoxides in human plasma. **Free radical Biology & Medicine**, v.31, n.3, p. 331-335, 2001.

LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict sêmen fertility? **Animal Reproduction Science**. v.60-61, p.327-336,2000.

MAIA, M.A. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), Trolox-C e Catalase**. 2006. 165p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; SOUSA, D.B.; RODELLO, L.; MEIRA, C. Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor na viabilidade do sêmen congelado de ovinos santa inês. **Veterinária e Zootecnia**. v.15, n.3, p.521-530, 2008.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; SICHERLE, C.C.; SOUSA, D.B.; RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**. v.85, p.85-90, 2009.

MALMGREM, L. Assessing the quality of raw semen: a review. **Theriogenology**, v.48, p.523-530, 1997.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1250-1259, 2002.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES, S.; MOCÉ, E.; VIUDES-DE-CARTRO, M.P.; VICENTE, J.S.; RODRIGUEZ, M. Use of powered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. **Reproduction Animal Domestic**. v.39, p.438-441, 2004.

MARTÍ, J.I.; MARTÍ, E.; CEBRIÁN-PÉREZ, MUIÑO-BLANCO. Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. **Theriogenology**, v.60, p.1025-1037, 2003.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. Physiol. Soc.**, p.125-142, 1984.

MEDEIROS, C.M.O., FORELL, F., OLIVEIRA, A.T.D., RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.

MORANI, E.S.C. **Quantificação dos radicais livres produzidos nas diferentes etapas do processamento de criopreservação do sêmen de touros**. 2004. 79p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.11, p.25-30, 1999.

MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v.127, p.285-291, 2004.

MORTIMER, S.T.; PANDYA, I.J.; SAWERS, R.S. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, p.93-102, 1986.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, n.5, p.403-439, 1997

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, .A; TAINTURIER, D.; ATON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.

NEILD, D., CHAVES, G., FLORES, M., MORA, N., BECONI, M., AGÜERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

OEHNINGER, S., DURU, N.K., SRISOMBUT, C., MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Molecular Cell Endocrinology**, v.169, p.3-10, 2000.

OLIVEIRA, J.F.C.; NEVES, J.P.; LUZ. Utilização de orvus es paste e beta amilase no congelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.12, n.2, p.107-113, 1988.

OLLERO, M., PEREZ-PE, R., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIAN-PEREZ, J.A. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. **Cryobiology**, v.37, p.1-12, 1998.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MACKINNON, A.O. **Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination**. Fort Collins, CO: Colorado State University. Animal Reproduction Laboratory, 1987. (Bulletin, n.3).

REZK, B. M.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DER VIJGHA, W.J.F.; BAST, A. The extraordinary antioxidant activity of vitamin E phosphate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1683, p. 16– 21, 2004.

ROBAYO, I.; MONTENEGRO, V.; VALDÉS, C.; COX, J.F. CASA Assessment of Kinematic Parameters of Ram Spermatozoa and their Relationship to Migration Efficiency in Ruminant Cervical Mucus. . **Reproduction Animal Domestic**. v. p. , 2008.

ROBERTSON, L.; WOLF, D.P.; TASH, J.S. Temporal changes in motility parameters related to acrossosomal status: identification and characterization of populations of hyperractivated human sperm. **Biology of Reproduction**, v.39, p.797-805, 1988.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. Review I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185-249, 1995.

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

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

SARLOS, P.; MOLNAR, A.; KOKAI, M. GABOR, G.Y.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.50, n.2, p.235-245, 2002.

SCOTT, J.W.; CORT, W.M.; HARLEY, H.; PARRISH, D.R.; SAUCY, G. 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.51, p.200-203, 1974.

SENGOKU, K.; TAMATE, K.; YOSHIDA, T.; TAKAOKA, Y.; MIYAMOTO, T.; ISHIKAWA, M. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida bindingability of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 3, p. 522-527, 1998

SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v.48, n.6, p.835-850, 1996

SILVA, K.M.G.; MORAES, T.A.P.; SILVA, E.C.B.; GAMBOA, S.C.; GUERRA, M.M.P. Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozóides eqüinos após descongelação. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n.1, p.42-49, 2009.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

SINGER, S.J.; NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the struture of cells membranes. **Science**, v.175, p.720-731, 1972.

SOUSA, D.B. **Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial**. Botucatu, 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

SPUNGIN, B., MARGALIT, I., BREITBART, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. **Journal Cell Science**, v.108, p.2525-35, 1995.

SU, L.; LI, X., QUAN, J.; YANG, S.; LI, Y.; HE, X.; TANG, X. A comparison of the protective action of added egg yolk from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. **Animal Reproduction Science** v.104, p.212-219, 2008.

TANNO, P.H. **Estudo das alterações morfo-funcionais de espermatozóides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo.** 2009. 100p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

UPRETI, G.C; JENSEN, K.; OLIVER, J.E.; DUGANZICH, D.M.; MUNDAY, R.; SMITH, J.F. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.269-278, 1997.

VALCÁRCEL, A., DE LAS HERAS, M. A., PÉREZ, L., MOSES, D.F., BALDASSARRE, H. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v.45, p.299-309, 1997.

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

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.23-53, 2000.

WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-1, p.481-492, 2000

WATSON, P.F. The of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G.J.; CLARKE, A. (Eds). **Effts of low temperatures on biological membranes.** London: Academic Press, 1981. p.189-218.

WATSON, P.F. The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.42, p.105-111. 1975.

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction Fertility Development**, v.5, p.639-58, 1993.

WILHELM, K.M.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion sperm prior to and after cryopreservation. **Cryobiology**, v.33, p.320-329, 1996.

WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R.; LADHA, S; JONES, R. regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.59, p. 1506-1514, 1998.

11. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho enviado para o periódico Revista “**Veterinária e Zootecnia**”

ISSN: 0102-5716

Normas para publicação disponível em:

<http://www.fmvz.unesp.br/revista/port/instrucoes.htm>

**IMPLICAÇÕES DA REDUÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE GEMA DE OVO
NO MEIO GLICINA-GEMA-LEITE SOBRE A CINÉTICA, MORFOLOGIA E
INTEGRIDADE DE MEMBRANAS ESPERMÁTICAS EM SÊMEN OVINO
CRIOPRESERVADO**

Leandro Rodello¹
Sony Dimas Bicudo²
Marcel Barbosa Falleiros¹
Claudia Dias Monteiro¹
Sabrina Missae Sakashita¹

RESUMO

Objetivou-se estudar os efeitos da redução na proporção da gema de ovo no meio diluidor Glicina-Gema-Leite, utilizando-se quatro ejaculados de cada carneiro das raças Santa Inês (n=4) e Dorper (n=4), colhidos por meio de vagina artificial. Após as avaliações macro e microscópicas, o sêmen foi mantido sob temperatura de 32°C e diluído para atingir-se concentração de 400 x 10⁶ espermatozóides/mL no meio Glicina-Gema-Leite (GGL) contendo 20% (GGL20), 15% (GGL15), 10% (GGL10) ou 5% (GGL5) (v/v) de gema de ovo. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, e em seguida, as amostras foram refrigeradas e congeladas em sistema com controle automatizado. A descongelação foi feita em banho-maria à 40°C/20 segundos. A cinética espermática foi determinada em sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA) e a integridade total das membranas espermáticas pela combinação dos fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e iodeto de propídio (IP). Na análise pós-descongelação, as motilidades total (MT) e progressiva (MP) nos tratamentos GGL10 e GGL5 foram maiores (P<0,05) do que no GGL20. O sêmen criopreservado nos meios GGL10 e GGL5 apresentaram maior percentual de espermatozóides com membranas íntegras do que no meio GGL20 (P<0,05). Frente aos resultados obtidos, conclui-se que, é possível reduzir a proporção de gema de ovo do meio diluidor Glicina-Gema-Leite até 5%, sem alterar parâmetros quali quantitativos do sêmen ovino criopreservado.

Palavras chave: Criopreservação; Gema de ovo; sêmen ovino.

¹ Pós-graduando, DRARV- FMVZ – UNESP, Botucatu-SP

² Docente, DRARV – FMVZ – UNESP, Botucatu-SP

Leandro Rodello, Rua Manoel José A. L. Gimenes, 288, CEP 18609-390, Botucatu-SP, Fone: (14) 3814-0833, e-mail: rodello@fmvz.unesp.br

**IMPLICATIONS OF REDUCTION IN CONCENTRATION OF EGG YOLK IN
THE EXTENDER GLYCINE-YOLK-MILK ON THE KINETICS,
MORPHOLOGY AND SPERMATIC MEMBRANES INTEGRITY IN SEMEN
CRYOPRESERVED OVINE**

ABSTRACT

The objective of the study was check the effects of reduction in the proportion of egg yolk in the extender Glycine-yolk-milk, using four ejaculates from each ovine of Santa Inês breed (n=4) and Doper breed (n=4), collected using artificial vagina. After the assessment, macro and microscopic, semen was kept at a temperature of 32°C and diluted to achieve concentrations up to 400 x 10⁶ sperm / mL in the extender Glycine-yolk-milk containing 20% (GGL20), 15% (GGL15), 10% (GGL10) ou 5% (GGL5) (v/v) of egg yolk. The semen was stored in straws of 0.25 mL, and then, samples were refrigerated and frozen in system with automated control. Thawing was done in a water bath to 40°C/20 seconds. The spermatic kinetics was determined in sperm computerized semen analysis (CASA) and the overall integrity of spermatic membranes by the combination of fluorochromes carboxyfluorescein diacetate (DIC) and propidium iodide (IP). In analyzing post-thawing, motilities total (MT) and progressive (MP) in the treatments GGL10 and GGL5 were higher (P <0.05) than in GGL20. Semen cryopreserved in extender GGL10 and GGL5 showed higher percentages of spermatozoon with intact membranes than in the extender GGL20 (P <0.05). Given our results, we conclude that it is possible to reduce the proportion of egg yolk extender Glycine-yolk-milk up to 5% without altering some of the quality quantitative parameters of semen cryopreserved ovine.

Key words: Cryopreservation, Egg yolk; ovine semen.

1 IMPLICACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE YEMA
2 DE HUEVO EN EL MEDIO GLICINA-YEMA-LECHE SOBRE LA CINÉTICA,
3 MORFOLOGÍA E INTEGRIDAD DE MEMBRANAS ESPERMÁTICAS EN
4 SEMEN OVINO CRIOPRESERVADO
5

6 RESUMEN

7 El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la reducción en la proporción de
8 yema de huevo en el diluyente Glicina-Yema-Leche, utilizando cuatro eyaculados de
9 cada carnero de las razas Santa Inés (n=4) y Dorper (n=4), colectados mediante vagina
10 artificial. Después de las evaluaciones macro y microscópicas, el semen fue mantenido a
11 32°C y diluido hasta alcanzar la concentración de 400×10^6 espermatozoides/mL en el
12 medio Glicina-Yema-Leche conteniendo 20% (GGL20), 15% (GGL15), 10% (GGL10)
13 o 5% (GGL5) (v/v) de yema de huevo. El semen fue empacado en pajillas de 0.25 mL y
14 las muestras fueron refrigeradas en seguida y congeladas en un sistema con control
15 automatizado. La descongelación fue hecha en baño María a 40°C/20 segundos. La
16 cinética espermática fue determinada en el sistema computarizado de análisis de semen
17 (CASA) y la integridad total de las membranas espermáticas por la combinación de los
18 fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e ioduro de propidio (IP). En el
19 análisis post-descongelación, las motilidades total (MT) y progresiva (MP) en los
20 tratamientos GGL10 y GGL5 fueron mayores ($P < 0,05$) de que en GGL20. El semen
21 criopreservado en los medios GGL10 y GGL5 presentó mayor porcentaje de
22 espermatozoides con membranas integras de que en el medio GGL20 ($P < 0,05$). Frente a
23 los resultados obtenidos se concluyó que es posible reducir la proporción de yema de
24 huevo del diluyente de Glicina-Yema-Leche hasta en 5% sin alterar algunos de los
25 parámetros cualitativos y cuantitativos del semen ovino criopreservado.

26
27 Palabras Clave: Criopreservación; Yema de huevo; semen ovino.
28
29
30
31
32
33
34

1 INTRODUÇÃO

2 O processo de criopreservação é extremamente complexo e vários são os fatores
3 que podem influenciar seus resultados, havendo sempre uma subpopulação de
4 espermatozóides não adaptados a tal processo (SALAMON e MAXWELL, 2000).

5 Existe grande variabilidade de resposta das amostras a serem processadas durante
6 as etapas de refrigeração, congelação e descongelação (OLLERO et al., 1998), sendo as
7 alterações na composição da membrana dos espermatozóides, distribuição de
8 fosfolípideo e colesterol (WHITE, 1993) e a razão entre a quantidade de ácidos graxos
9 saturados e insaturados, fatores que atuam diretamente na qualidade final do sêmen
10 criopreservado (SALAMON e MAXWELL, 2000).

11 O diluídor ou meio de congelação exerce importante papel no processo da
12 criopreservação e a variação em sua composição influencia as taxas de sobrevivência
13 espermática após a congelação/dcongelação. Nas ultimas décadas, dezenas de
14 formulações de meios diluidores têm sido propostas e vários tipos de substâncias
15 crioprotetoras foram incorporadas em suas composições. As substâncias, com
16 reconhecida ação crioprotetora, atualmente mais utilizadas são a gema de ovo e o
17 glicerol.

18 Devido a seu efeito benéfico sobre a conservação de espermatozóides, a
19 incorporação de gema de ovo (1,5 a 50%) aos diluidores é de uso consagrado sendo o
20 constituinte mais prevalente em boa parte das formulações. A gema de ovo associada a
21 outros ingredientes previne o choque térmico, preserva a motilidade e a integridade das
22 membranas plasmáticas e acrossomal (AMIRAT et al., 2004). Atua também, como um
23 protetor osmótico, permitindo uma maior tolerância dos espermatozóides a soluções
24 hipo e hiperosmóticas. A proteção que exerce durante a congelação se deve a sua adesão

1 à membrana plasmática, especialmente dada pela fração lipoprotéica de baixa densidade
2 (LDL) (MOUSSA et al., 2002; BERGERON e MANJUNATH, 2006).

3 Porém, nos últimos anos a sua utilização tem sido questionada devido a
4 variabilidade em sua composição e risco sanitário em veicular agentes microbiológicos
5 específicos para regiões isentas, conseqüente à deficiente rastreabilidade de sua origem.
6 Há também um constante risco potencial de contaminação por microorganismos como
7 bactérias e micoplasmas, que podem acarretar na geração de endotoxinas deletérias à
8 capacidade fertilizante do espermatozóide (BOUSSEAU et al., 1998; GIL et al., 2003).

9 Atribui-se a gema de ovo efeito de redução na integridade acrossomal em bodes
10 (ABOAGLA e TERADA, 2004), e altas concentrações reduzem a viabilidade
11 espermática pós-descongelação em bodes, carneiros (SALAMON e MAXWELL, 1995)
12 e búfalos (KUMAR et al., 2003).

13 A uniformidade na preparação dos diluidores de sêmen contendo gema de ovo é
14 difícil de ser atingida devido às características individuais, como idade do ovo e tipo de
15 alimentação das aves.

16 O objetivo deste estudo foi testar as implicações da redução na proporção de gema
17 de ovo do diluidor Glicina-Gema-Leite sobre a cinética, morfologia e integridade das
18 membranas espermáticas no sêmen ovino criopreservado.

19 **MATERIAL E MÉTODOS**

20 **Colheita do sêmen**

21 Os procedimentos foram conduzidos no Laboratório de Estudos em Biotecnologia
22 Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Laboratório do Centro de
23 Diagnóstico e Biotecnologia em Reprodução Animal (CERAN), do Departamento de
24 Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da
25 Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu.

Foram utilizados, 4 carneiros da raça Santa Inês e 4 carneiros da raça Dorper, com idade entre 10 a 84 meses, com pesos entre 60 a 110kg. O sêmen foi colhido pelo método de vagina artificial a temperatura de 42°C com copo coletor graduado pré-aquecido à 37°C. De cada reprodutor foram coletados 4 ejaculados.

Após cada colheita o sêmen foi avaliado quanto ao aspecto e o volume através da graduação do copo coletor e mantido em banho-maria a 32°C. Dez microlitros (µL) foram diluídos em quatro mililitros (mL) de água destilada com taxa de diluição 1:400, para a realização da concentração espermática em câmara de Neubauer.

Análise computadorizada da cinética espermática (CASA)

Para a avaliação, a fresco e pós-descongelação uma alíquota do sêmen foi diluída em 100µL de X-Cell® (IMV, France), mantendo uma concentração final de aproximadamente 48×10^6 espermatozoides/mL (DAVIS et al., 1992) em seguida 6µL do sêmen diluído foram transferidos para câmara de Makler (Makler Counting Chamber – Sefi-Medical, Haifa, Israel) aquecida a 37°C e submetida à análise computadorizada da cinética espermática (Hamilton Thorn Motility Analyser - HTMA – IVOS 12 – Hamilton Research – Beverly, MA, USA), onde foram avaliados em três campos selecionados aleatoriamente, os seguintes parâmetros: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, µm), frequência de batimentos do flagelo (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

Os padrões utilizados para o ajuste do aparelho foram: *frame per second*: 60; *frame acquire*: 30; *minimum contrast*: 60; *minimum cell size*: 5pix; *cell size*: 5pix; *cell intensity*: 55; *path velocity (VAP)*: 75µ/s; *straightness (STR)*: 80.0%; *slow cells*: static; *VAP cut off*: 21.9µ/s; *VSL cut off*: 6.0µ/s.

Análise de Integridade total das membranas espermáticas

Para a análise da integridade total das membranas espermáticas (IMB) a fresco e pós-descongelamento, foi preparada uma solução de trabalho adicionando a cada mL de solução salina, 20µL de formaldeído (2,5mg/mL em água destilada, Vetec, Brasil), 20µL de diacetato de carboxifluoresceína (DIC, Sigma, Germany) (0,46mg/mL de DMSO, Sigma, Germany) e 10µL de iodeto de propídio (IP, Sigma-Aldrich, USA) (0,5mg/mL de solução salina isotônica). Para realizar a análise, 50µL da solução de trabalho foi depositado em microtubos de fundo cônico de polipropileno (Axygen Scientific, Union City, USA) de 1,5 mL, em seguida foi acrescida uma alíquota de sêmen, ficando com uma concentração final de 10^7 espermatozóide/mL. Depois de incubado por no mínimo 8 minutos à temperatura de 30°C, 5µL dessa suspensão era depositado entre lâmina e lamínula e observado em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Leica DM LB, Germany) com filtro de excitação (BP) 450-490nm, espelho dicromático 510nm e filtro de supressão (LP) 515nm (HARRISON e VICKERS, 1990), onde 100 células/lâmina foram avaliadas e distribuídas percentualmente (%) em duas categorias: Íntegros (IMB) – espermatozóides com acúmulo de DIC (fluorescência verde) ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de IP (fluorescência vermelha) e Lesados - espermatozóides com acúmulo de IP ao longo da cabeça e flagelo, sem acúmulo de DIC, acúmulo de DIC na peça intermediária e acúmulo de IP na cabeça unicamente e acúmulo de fluorescência amarelada na região acrossomal; acúmulo de IP na cabeça e de DIC na peça intermediária.

Análise da Morfologia Espermática

Para a análise da morfologia espermática, 10µL de sêmen foram diluídos em 500µL de solução de Glutaraldeído à 0,2% (BARTH e OKO, 1989). Para a leitura foi utilizada a microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x sob imersão através

de preparações úmidas, colocando-se uma gota entre lâmina e lamínula e classificando-se 100 células por preparação, de acordo com Blom (1973). Nas análises dos dados, enfocaram-se espermatozóides com integridade de acrossomo (ACROS, %) e aqueles com cauda dobrada (CAUDA, %).

Criopreservação do sêmen

Após as avaliações do ejaculado, o sêmen foi dividido em quatro tratamentos tendo como base o diluidor GGL (GONZALEZ, 1996): GGL com 20% (v/v) de gema de ovo (GGL20, Osmolaridade: 277mOsm e pH: 7,01); GGL com 15% (v/v) de gema de ovo (GGL15, Osmolaridade: 287mOsm e pH: 7,01); GGL com 10% (v/v) de gema de ovo (GGL10, Osmolaridade: 279mOsm e pH: 7,11); GGL com 5% (v/v) de gema de ovo (GGL5, Osmolaridade: 288mOsm e pH: 7,20).

As diluições foram feitas em duas etapas em temperatura de 32°C: primeiramente a fração um (não glicerolizada) e em seguida a fração dois (glicerolizada). O sêmen diluído foi envasado em palhetas (IMV, France) de 0,25 mL na concentração final de 100×10^6 espermatozóides totais/doses. Em seguida, as palhetas eram colocadas no Sistema Automatizado de Refrigeração e Congelação (TK 3000®, TK Congelações, Brasil). A refrigeração de 32°C a 5°C ocorreu a uma taxa de 0,5°C/min. Após um período de 90 minuto, realizou-se a congelação, na qual, a curva de congelação consistia na queda de temperatura ocorria em duas fases, a primeira, na razão de 15°C/min, de 5°C positivos até 80°C negativos e a segunda a 10°C/min de 80°C negativos até atingir-se 120°C negativos. Com o fim da congelação, as palhetas eram retiradas do porta-palhetas e submersas em nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico até avaliação.

A descongelação foi realizada em banho-maria à 40°C por 20 segundos. De cada tratamento foram descongeladas e avaliadas 4 palhetas de sêmen por carneiro, sendo

uma palheta de cada ejaculado. Após a descongelação o sêmen foi depositado em microtubo e mantido aquecidos a 37°C para realizar a Análise computadorizada da cinética espermática, Análise de Integridade total das membranas espermáticas e Análise da Morfologia Espermática.

Análise estatística

Os dados foram analisados em um delineamento de blocos ao acaso, com quatro tratamentos e 8 blocos (carneiros). Para a análise dos dados utilizaram-se as médias dos valores obtidos das quatro amostras. Como as variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5% (FISHER & BELLE, 1993). Foi utilizado o programa Biostat[®] versão 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises computadorizada da cinética espermática, análise de Integridade total das membranas espermáticas e análise da Morfologia Espermática pós-descongelação, são apresentadas na Tabela 1.

Após a descongelação a MT e MP nos tratamentos com 10% (52,2%) e 5% (58,5%) de gema de ovo foram superiores ao GGL20 (40,5%) (Tabela 1, $P < 0,05$).

O fato de se realizar a redução da gema de ovo, também não interferiu nas motilidades total e progressiva no experimento de Gil et al. (2003), utilizando um meio a base de leite contendo 5% , 10% , 15% e 20% de gema de ovo.

Marco-Jimenez et al (2004), compararam a utilização de gema de ovo em pó e gema de ovo fresca com 10%, 15% e 20% em meio TRIS, observaram que a motilidade, entre as concentrações 10% (65%), 15% (62%) e 20% (65%) de gema de ovo fresca não houve diferença, mas o TRIS com a gema de ovo em pó foi superior (69%).

Os resultados das velocidades espermáticas realizadas pelo CASA, estão apresentadas da Tabela 1. A VAP dos espermatozóides criopreservados em GGL15 (113,2 μ m/s), GGL10 (115,0 μ m/s) e GGL5 (117,7 μ m/s) foram significativamente maiores que o GGL20 (105,7 μ m/s) ($P<0,05$). Quanto ao VSL, o GGL5 (102,2 μ m/s) foi maior que o GGL20 (91,9 μ m/s) ($P<0,01$), enquanto que o GGL15 (99,6 μ m/s) e o GGL10 (99,9 μ m/s) não diferiram do GGL20 e nem do GGL5. Já na VCL, os diluidores GGL10 (191,3 μ m/s) e GGL5 (200,7 μ m/s) foram melhores do que o GGL20 (156,5 μ m/s) e GGL15 (171,8 μ m/s) ($P<0,01$).

Quanto ao comportamento das velocidades, de um modo geral, observou-se que diminuindo as concentrações de gema de ovo, as velocidades foram aumentando, estas características podem estar ligadas com a glicina e frutose. No preparo dos meios, devido à redução na concentração da gema de ovo, foi preciso aumentar as quantidades de alguns ingredientes, entre eles a glicina e frutose. Segundo Aisen et al. (1990), a glicina fornece uma maior quantidade de substrato energético para a movimentação espermática, que é sintetizado a partir da serina podendo ser degradado à piruvato, gerando 2ATP.

O ALH foi maior ($P<0,05$) nos espermatozóides criopreservados com os meios diluidores GGL10 (6,2 μ m) e GGL5 (6,3 μ m), do que no GGL20 (5,4 μ m) e GGL15 (5,4 μ m) (Tabela 1).

Em relação ao valor do batimento flagelar (BCF) dos espermatozóides criopreservados, o GGL5 (46,5Hz) foi maior ($P<0,05$) do que os congelados com GGL20 (41,0%), GGL15 (43,3%) e GGL10 (44,7%), sendo estes iguais entre si (Tabela 1).

Os valores de retilinearidade (STR) é uma comparação da linha reta com a média das trajetórias, que fornece uma indicação da relação entre o espaço ganho e a trajetória

1 geral do espermatozóide. Nos resultados pós-descongelção a STR não teve diferença
2 significativamente entre os tratamentos.

3 A linearidade (LIN) foi significativamente maior ($P<0,05$) nos espermatozóides
4 criopreservados nos meios GGL20 (58,4%) e GGL15 (56,9%) do que naqueles
5 criopreservados no GGL10 (52,1%) e GGL5 (50,2%) (Tabela 1).

6 Uma trajetória circular teria uma baixa LIN, o caminho curvilíneo seria muito
7 maior do que o espaço ganho e uma alta LIN, na trajetória indica que o espermatozóide
8 tem o seu movimento mais próximo de uma reta (MORTIMER, 1997). No presente
9 estudo, os espermatozóides congelados nos diluidores GGL10 e o GGL5 tiveram
10 trajetória menos linear em seu percurso comparado com o GGL20 e GGL15.

11 Alguns valores dos parâmetros observados pela CASA têm sido correlacionados
12 com eventos ligados à fertilidade. Em humanos, um padrão de cinética com uma alta
13 motilidade progressiva associado a um movimento lateral de cabeça aumentado, tem
14 sido correlacionado com habilidade de penetrar no muco cervical (AITKEN et al., 1985;
15 MORTIMER et al., 1986).

16 Para Verstegen et al. (2002), o VCL e o VAP predizem resultados no processo de
17 fertilização, visto que, ambos os parâmetros são aumentados após a capacitação
18 espermática. Alguns autores têm investigado os padrões de hiperativação dos
19 espermatozóides de várias espécies, inclusive a ovina, na comparação do
20 comportamento da cinética espermática em diferentes condições *in vivo* e *in vitro*
21 (MORTIMER e MAXWELL, 2004).

22 Em muitos casos, os parâmetros mensurados pela CASA, são subutilizados para
23 estabelecer uma relação entre os efeitos *in vivo* e *in vitro* para avaliar a qualidade do
24 sêmen.

1 Após a descongelação, a integridade de membranas foi maior ($P < 0,05$) nos
2 espermatozóides criopreservados nos meios diluidores GGL10 (41,9%) e GGL5
3 (42,5%) do que no GGL20 (34,6%). O aumento na integridade de membranas e
4 integridade acrossomal pode estar relacionada com a proporção de gema de ovo: *Orvus*
5 *Es Paste* (OEP) contido nos meios, atuando diretamente sobre as membranas
6 espermáticas e na solubilidade dos componentes ativos da gema de ovo (EL-ALAMY e
7 FOOTE, 2001).

8 Estudos com bovinos (ARIOLA e FOOTE, 1987) e ovinos (MAIA et al., 2008),
9 demonstraram que a concentração do surfactante lauril sulfato de sódio (OEP) depende
10 da concentração de gema de ovo no meio diluidor.

11 Ariola e Foote (1987) relataram que a concentração ideal para um meio diluente
12 com 20% de gema de ovo fique entre 0,5 a 1%, fato esse não ocorre com o GGL20
13 (0,4% de OEP). Provavelmente o aumento da proporção entre gema de ovo e OEP, nos
14 meios GGL10 e GGL5 influenciou nas alterações dos fosfolipídios da gema de ovo e/ou
15 das membranas espermáticas. Segundo El-Alamy e Foote (2001), o OEP pode atuar
16 diretamente nas membranas espermáticas, alterando a sua permeabilidade, ou sobre a
17 gema de ovo, alterando a estrutura dos fosfolipídios, prevenindo contra estresse
18 osmótico.

19 Oliveira et al. (1988), usando 0,5% de OEP, Akuorki et al. (2004), utilizando 0,7%
20 de Equex-STM e Maia et al., (2008) acrescentando de 0,5 a 1% ao TRIS, obtiveram
21 efeitos benéficos sobre a integridade de membrana plasmática e acrossomal em sêmen
22 de ovino criopreservados.

23 Vishwanath e Sannon (2000), apontaram a gema de ovo como uma importante
24 fonte de aminoácidos aromáticos para a formação de radicais livres, principalmente de
25 H_2O_2 , e taxa de formação de ROS teria relação direta com a da concentração de gema

de ovo no meio diluente. Entretanto, ao reduzirem a concentração deste componente de 20% para 5% em meio de congelação, não constataram interferência sobre os índices de fertilidade.

CONCLUSÃO

Diante das condições experimentais e com base nos dados obtidos, concluímos, que a proporção da gema de ovo na formulação do meio diluidor Glicina-Gema-Leite pode ser reduzida, até a concentração de 5% sem implicar em prejuízo dos parâmetros qualitativo do sêmen criopreservado.

Projeto de pesquisa aprovado em 21 de setembro de 2006, protocolo nº 90/2006-CEEA.

REFERÊNCIAS

- ABOAGLA, E. M.-E.; TERADA, T. Effect of the supplementation of trehalose extender contain egg yolk with sodium dodecyl sulfate on freezability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.809-818, 2004.
- AISEN, E.G., CISALE, H., FERNANDEZ, H. Criopreservacion de semen ovino. Nueva técnica. **Veterinaria Argentina**, v.7, p.176-82, 1990.
- AITKEN, R.J., PATERSON, M., FISHER, H., BUCKINGHAM, D.W., VAN DU, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal. Cell Science**, v.180, p.2017-2025, 1995.
- AKOURKI, A.; GIL, L.; ECHEGARAY, A.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; DE BASS, I.; GONZALEZ, N.; GALLEGOS DE LA HOYA, M.; MEQUE, L.C. Effect of the extender supplement Equex-STM on cryopreserved semen in the Assaf sheep. **Cryo Letters**, v.25, n.2, p.147-154, 2004.

- 1 AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L. et al. Bull semen in vitro fertility
2 after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl[®], a commercial
3 egg yolk extender. **Theriogenology**, v. 61, p. 895-907, 2004.
- 4 ARIOLA, J.; FOOTE, R.H. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa
5 frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. **Journal of Dairy**
6 **Science**, v.70, n.8, p.1664-1670, 1987.
- 7 BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames:
8 Iowa State University Press, 1989. 285 p.
- 9 BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the
10 mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular and Reproduction**
11 **and Development**, v.73, p.1338-1344, 2006.
- 12 BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a
13 new classification of the bull spermogram. **Nord. Veterinaermed**, v.25, p.382-391,
14 1973.
- 15 BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.;
16 CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk
17 sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg
18 yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v.50, p.699-706, 1998.
- 19 DAVIS, R.O.; ROTHMANN, S.A.; OVERSTREET, M.D. Accuracy and precision of
20 computer-aided sperm analysis in multicenter studies. **Fertility and Sterility**, V.57, n.3,
21 p.648-653, 1992.
- 22 EL-ALAMY, M.A.; FOOTE, R.H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset
23 rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**, v.65, p.245-254,
24 2001.

- 1 FISHER, L.D.; BELLE, G.V. **Biostatistics A Methodology for the health**
2 **Sciences**. Wiley-Interscience, New York, 991p, 1993.
- 3 GIL, J., RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M., LUNDEHEIM, N., SÖDERQUIST, L.,
4 RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used
5 for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.1157-1170, 2003.
- 6 GONZALEZ, C.I.M. **Avaliação “in vitro” e “in vivo” de sêmen ovino (*Ovis aries*)**
7 **congelado em palhetas e “pellets” com diferentes diluidores**. 1996. 89p Tese
8 (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual
9 Paulista – UNESP, Botucatu.
- 10 HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane
11 integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v.88,
12 p.343-52, 1990.
- 13 KUMAR, S., MILLAR, J.D., WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival
14 of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate
15 cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p.246-253, 2003.
- 16 MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; SOUSA, D.B.; RODELLO, L.;
17 MEIRA, C. Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor na viabilidade
18 do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.3, p.521-
19 530, 2008.
- 20 MARCO-JIMÉNEZ, F.; PUCHADES, S.; MOCÉ, E.; VIUDES-DE-CARTRO, M.P.;
21 VICENTE, J.S.; RODRIGUEZ, M. Use of powered egg yolk vs fresh egg yolk for the
22 cryopreservation of ovine semen. **Reproduction Animal Domestic**, v.39, p.438-441,
23 2004.
- 24 MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M. Effect of medium on the kinematics of frozen-
25 thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v.127, p.285-291, 2004.

- 1 MORTIMER, S.T.; PANDYA, I.J.; SAWERS, R.S. Relationship between human sperm
2 motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro.
3 **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, p.93-102, 1986.
- 4 MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analusis of
5 sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, n.5, p.403-439,
6 1997.
- 7 MOUSSA, M; MARTINET, V.; TRIMECHE, .A; TAINTURIER, D.; ATON, M. Low
8 density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective
9 effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.
- 10 OLIVEIRA, J.F.C.; NEVES, J.P.; LUZ. Utilização de orvus es paste e beta amilase no
11 congelamento de sêmen ovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.12, n.2,
12 p.107-113, 1988.
- 13 OLLERO, M., PEREZ-PE, R., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIAN-PEREZ, J.A.
14 Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality
15 parameters and heterogeneity analysis. **Cryobiology**, v.37, p.1-12, 1998.
- 16 SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. Review I.
17 Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal**
18 **Reproduction Science**, v.37, p.185-249, 1995.
- 19 SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction**
20 **Science**, v.62, p.77-111, 2000.
- 21 VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted sêmen
22 analyzer in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-
23 179, 2002.
- 24 VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen
25 state. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.23-53, 2000.

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction Fertility Development**, v.5, p.639-58, 1993.

IMPLICAÇÕES DA REDUÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE GEMA DE OVO NO MEIO GLICINA-GEMA-LEITE SOBRE A CINÉTICA, MORFOLOGIA E INTEGRIDADE DE MEMBRANAS ESPERMÁTICAS EM SÊMEN OVINO CRIOPRESERVADO

TABELA 1: Médias $\pm$ erro padrão dos parâmetros da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado, morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas pós-descongelamento do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).

PARÂMETROS	DILUIDORES			
	GGL20	GGL15	GGL10	GGL5
MT (%)	40,5 $\pm$ 3,0 ^{Bc}	47,7 $\pm$ 2,3 ^{bc}	52,2 $\pm$ 2,9 ^{ab}	58,5 $\pm$ 2,3 ^{Aa}
MP (%)	23,9 $\pm$ 2,6 ^{Bc}	30,7 $\pm$ 2,2 ^{bc}	35,0 $\pm$ 3,0 ^{ab}	40,9 $\pm$ 2,3 ^{Aa}
VAP (μ m/s)	105,7 $\pm$ 5,4 ^{Bb}	113,2 $\pm$ 5,0 ^a	115,0 $\pm$ 5,1 ^{Aa}	117,7 $\pm$ 4,8 ^{Aa}
VSL (μ m/s)	91,9 $\pm$ 5,2 ^{Bb}	99,6 $\pm$ 4,8 ^{ab}	99,9 $\pm$ 4,8 ^{ab}	102,2 $\pm$ 4,6 ^{Aa}
VCL (μ m/s)	156,5 $\pm$ 7,8 ^{Bb}	171,8 $\pm$ 8,8 ^{Bb}	191,3 $\pm$ 10,1 ^{Aa}	200,7 $\pm$ 8,6 ^{Aa}
ALH (μ m)	5,4 $\pm$ 0,2 ^{Cb}	5,4 $\pm$ 0,2 ^{BCb}	6,2 $\pm$ 0,2 ^{ABa}	6,3 $\pm$ 0,2 ^{Aa}
BCF (Hz)	41,0 $\pm$ 0,7 ^{Cc}	43,3 $\pm$ 0,8 ^{BCbc}	44,7 $\pm$ 0,8 ^{ABbc}	46,5 $\pm$ 0,6 ^{Aa}
STR (%)	82,8 $\pm$ 1,2	83,0 $\pm$ 1,1	82,9 $\pm$ 0,7	83,0 $\pm$ 0,8
LIN (%)	58,5 $\pm$ 1,4 ^{Aa}	56,9 $\pm$ 1,6 ^{ABa}	52,1 $\pm$ 1,1 ^{BCb}	50,2 $\pm$ 1,0 ^{Cb}
ACROS (%)	87,6 $\pm$ 0,5 ^b	86,9 $\pm$ 0,4 ^{ab}	88,1 $\pm$ 0,4 ^{ab}	88,4 $\pm$ 0,4 ^a
CAUDA (%)	6,9 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 0,4	5,1 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,2
IMB (%)	34,6 $\pm$ 1,7 ^b	40,6 $\pm$ 1,8 ^{ab}	41,9 $\pm$ 2,1 ^a	42,5 $\pm$ 2,1 ^a

Média seguida de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,01$ pelo teste de Tukey.

Média seguida de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

- **Análise computadorizada (CASA)** – MT – Percentual de motilidade total; MP – Percentual de motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva; VCL – Velocidade curvilínea; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilinearidade; LIN – Linearidade.
- **Morfologia espermática** – Acros – acrossomos íntegros e Cauda – caudas dobradas.
- **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente

12. ANEXO I

12.1. MEIO PARA CONGELAÇÃO DO SÊMEN

INGREDIENTE	MEIO DILUIDOR			
	GGL20	GGL15	GGL10	GGL5
Solução A				
Glicina - Botica ao veado d'ouro		1,4g		
Citrato de sódio – Sigma, S4641		2,97g		
Água destilada		100mL		
Solução B				
Frutose – Sigma, F3510		3,0g		
Água destilada		100mL		
Solução A+B				
Amicacina		0,02g		
MEIO I				
Solução A+B	60mL	65mL	70mL	75mL
Gema de ovo	20mL	15mL	10mL	5mL
Orvus es Paste - OEP – Procter & Gambler		0,4mL		
Leite desnatado 11% - La Serenissima		15mL		
Água destilada		4,6mL		
MEIO II				
Solução A+B	54mL	59mL	64mL	69mL
Gema de ovo	20mL	15mL	10mL	5mL
Orvus es Paste - OEP		0,4mL		
Leite desnatado 11%		15mL		
Glicerol – Sigma, G2025		10mL		

12.2. SONDAS FLUORESCENTES DIACETATO DE CARBOXIFLUORESCEINA E IODETO DE PROPÍDIO (HARRISON e VICKERS, 1990)

SOLUÇÃO ESTOQUE

SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO (2,5mg/mL)

Formaldeído a 37% - Vetec	10 μ L
Água destilada	1500 μ L
Armazenar entre 4 a 8°C por no máximo 4 dias	

SOLUÇÃO DE DIACETATO DE CARBOXIFLUORESCEINA (DIC)

Diacetato de carboxifluoresceína – Sigma, P4170	0,46mg
DMSO – Sigma, D2650	1mL
Após o preparo armazenar protegido da luz a -20°C	

SOLUÇÃO DE IODETO DE PROPÍDIO (IP)

Iodeto de propídio – Sigma-Aldrich, 28,707,5	0,5mg
Solução salina isotônica	1mL
Após o preparo armazenar protegido da luz a -20°C	

SOLUÇÃO DE TRABALHO

Solução Salina	1mL
Solução de formaldeído	20 μ L
Solução de DIC	20 μ L
Solução de IP	10 μ L

12.3. SOLUÇÃO DE PBS E SOLUÇÃO DE GLUTARALDEÍDO a 0,2%

(BARTH e OKO, 1989)

Solução estoque de NaH_2PO_4

NaH_2PO_4 (Sigma – S5011)	0,8g
Água destilada q.s.p.	100mL

Solução estoque de Na_2HPO_4

Na_2HPO_4	0,947g
Água destilada q.s.p.	100mL

Solução final de PBS

Solução estoque de NaH_2PO_4	30,0mL
Solução estoque de Na_2HPO_4	70,0mL
NaCl (JT-Baker – 3624-19)	0,45g

Solução de Glutaraldeído a 0,2%

Solução de Glutaraldeído a 50% (Vetec – S0805)	0,4mL
PBS (q.s.p.)	100,0mL

Armazenar a 5°C

12.4. ENSAIO DA LIPOPEROXIÇÃO PELO MÉTODO TBA

REAGENTES

Ácido tricloroacético (Trichloroacetic acid AR) Mallinckrodt Baker, 2928;

Ácido Tiobarbitúrico (2 – Thiobarbituric acid) Fluka, 88481;

Ácido clorídrico – HCl (Hydrochloric acid) JT Baker, 9535-02;

Hidroxitolueno butilado – BHT (Butylated hydroxytoluene) Aldrich, A-06107TC;

Sulfato ferroso: Iron (II) Sulfate heptahydrate ($\text{FeO}_4\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Fluka, 44970;

Ascorbato de sódio, Sigma-Aldrich, A-7631-25G;

Malonaldeído – MDA: 1,1,3,3-tetrametoxopropano (Malonaldehyde bis – Dimetil acetal), Aldrich, 10.838-3.

REAGENTE TBA

Ácido Tricloroacético 15%

Ácido Tiobarbitúrico 0,375%

HCL 0,25M

REAGENTES	Quantidade de solução a ser preparada	
	1 litro	100mL
Ácido Tricloroacético	150g	15g
Ácido Tiobarbitúrico	3,75g	0,375g
HCl	9,115mL	0,9115mL
Água destilada q.s.p.	1000mL	100mL

Dissolver o ácido Tricloroacético em água, depois acrescentar o ácido Tiobarbitúrico e HCl e completar para o volume deseje. A água pode ser aquecida para ajudar a dissolver o ácido Tiobarbitúrico. Dividir em pequenas quantidades e congelar.

SOLUÇÃO DE HIDROXITOLUENO BUTILADO (BHT) 50mM

REAGENTES	Quantidade de solução a ser preparada	
	100mL	10mL
BHT	1,102g	0,1102g
Etanol	100mL	10mL

SOLUÇÃO DE SULFATO FERROSO 2,4mM

REAGENTES	QUANTIDADE
Sulfato ferroso: Iron (II) Sulfate heptahydrate	0,013344g
Água destilada	20mL

Adicionar 100 μ L para 1mL de amostra, concentração final de 0,24mMol.
 Guardar em geladeira e utilizar por no máximo 5 dias.

SOLUÇÃO DE ASCORBATO DE SÓDIO 50mM

REAGENTES	QUANTIDADE
Ascorbato de sódio	0,09906g
Água destilada	10mL

Guardar em geladeira protegido da luz e utilizar por no máximo 5 dias.

SOLUÇÃO ESTOQUE DE MALONALDEÍDO A 10mM
(Malonaldehyde bis – Dimetil acetal – 1,1,3,3- tetrametoxopropano)

REAGENTES	QUANTIDADE
Solução comercial de MDA	166 μ L
Solução HCl 2N	100mL
Preparar diariamente, antes de iniciar o ensaio.	

SOLUÇÃO DE HCl 2N (100mL)

REAGENTES	QUANTIDADE
HCl	24,3mL
Água destilada	75,7mL

12.5. "HAMILTON THORNE SETUP FOR IVOS-12.3"

ANALYSIS SETUP - RAM		
IMAGE CAPTURE		
Frames Per Sec.		60Hz
No. of Frames		30
CELL DETECTION		
Minimum Contrast		60
Minimum Cell Size		5pix
DEFAULTS (if < 5 Motile Cells)		
Cell Size		5pix
Cell Intensity		55
PROGRESSIVE CELLS		
Path Velocity (VAP)		75 μ /s
Straightness (STR)		80,0%
SLOW CELLS		
Slow Cells		Static
VAP Cutoff		21,9 μ /s
VSL Cutoff		6,0 μ /s
STATIC GATES (on QC Plots)		
MINIMUM		MAXIMUM
0.25	Static intensity gates	1,50
0.60	Static size gates	8,00
0	Static elongation gates	95
CALIBRATION		
Magnification		1.95
VIDEO SOURCE		
Frequency		60Hz
Field		Dark
ILUMINATION		
Intensity		2.400
Photometer	Low	73
	High	125
ANALYSIS CHAMBER		
Chamber type		Makler
Chamber depth		10.0 μ m
Stage position		14.3mm
Field selection		Automatic
Set stage temperature		37°C

13. ANEXO II

TABELA 8: Resumo da análise de variância da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado do sêmen ovino refrigerado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).

PARÂMETRO	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
MT (%)	Tratamentos	3	614,531	5,6660	0,0055
	Blocos	7	58,662	0,5409	0,7948
	Erro	21	108,460		
MP (%)	Tratamentos	3	729,115	8,8804	0,0008
	Blocos	7	129,699	1,5797	0,1958
	Erro	21	82,104		
VAP ($\mu\text{m/s}$)	Tratamentos	3	115,570	3,9990	0,0210
	Blocos	7	783,570	27,1133	<0,0001
	Erro	21	28,900		
VSL ($\mu\text{m/s}$)	Tratamentos	3	11929,425	1,7054	0,1956
	Blocos	7	-70371,965	-10,0603	0,9999
	Erro	21	6994,983		
VCL ($\mu\text{m/s}$)	Tratamentos	3	1049,854	6,8180	0,0025
	Blocos	7	1350,713	8,7718	0,0001
	Erro	21	153,983		
ALH (μm)	Tratamentos	3	1,896	21,0991	<0,0001
	Blocos	7	0,574	6,3802	0,0006
	Erro	21	0,090		
BCF (Hz)	Tratamentos	3	15,657	4,8111	0,0106
	Blocos	7	6,048	1,8585	0,1282
	Erro	21	3,254		
STR (%)	Tratamentos	3	37,775	9,3094	0,0006
	Blocos	7	29,560	7,2848	0,0003
	Erro	21	4,058		
LIN (%)	Tratamentos	3	127,762	10,1218	0,0004
	Blocos	7	46,335	3,6708	0,0097
	Erro	21	12,623		

▪ **Análise computadorizada (CASA)** – MT – Percentual de motilidade total; MP – Percentual de motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva; VCL – Velocidade curvilínea; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilinearidade; LIN – Linearidade.

TABELA 9: Resumo da análise de variância da morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas do sêmen ovino refrigerado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).

PARÂMETRO	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
ACROS (%)	Tratamentos	3	15289,950	2,2451	0,1119
	Blocos	7	-73483,650	-10,7898	1,0000
	Erro	21	6810,484		
CAUDA (%)	Tratamentos	3	175,533	2,6659	0,0733
	Blocos	7	-464,065	-7,0481	0,9996
	Erro	21	65,843		
IMB (%)	Tratamentos	3	186,548	5,3736	0,0068
	Blocos	7	83,664	2,4100	0,0558
	Erro	21	34,715		

- **Morfologia espermática – ACROS** – acrossomos íntegros e **CAUDA** – caudas dobradas;
- **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente.

TABELA 10: Resumo da análise de variância da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).

PARÂMETRO	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
MT (%)	Tratamentos	3	396,103	7,8224	0,0014
	Blocos	7	259,359	5,1219	0,0019
	Erro	21	50,637		
MP (%)	Tratamentos	3	359,983	9,3806	0,0006
	Blocos	7	321,020	8,3653	0,0002
	Erro	21	38,375		
VAP ($\mu\text{m/s}$)	Tratamentos	3	189,585	10,1161	0,0004
	Blocos	7	2568,133	137,0338	<0,0001
	Erro	21	18,741		
VSL ($\mu\text{m/s}$)	Tratamentos	3	111,390	4,9294	0,0096
	Blocos	7	2189,320	96,8840	<0,0001
	Erro	21	22,597		
VCL ($\mu\text{m/s}$)	Tratamentos	3	2821,090	28,9834	<0,0001
	Blocos	7	9002,144	92,4864	<0,0001
	Erro	21	97,335		
ALH (μm)	Tratamentos	3	1,914	9,9864	0,0005
	Blocos	7	7,976	41,6063	<0,0001
	Erro	21	0,192		
BCF (Hz)	Tratamentos	3	39,618	14,5690	<0,0001
	Blocos	7	32,064	11,7912	<0,0001
	Erro	21	2,719		
STR (%)	Tratamentos	3	0,021	0,0038	0,9995
	Blocos	7	19,152	3,4983	0,0121
	Erro	21	5,475		
LIN (%)	Tratamentos	3	121,183	13,8988	0,0001
	Blocos	7	63,417	7,2734	0,0003
	Erro	21	8,719		

▪ **Análise computadorizada (CASA)** – MT – Percentual de motilidade total; MP – Percentual de motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva ; VCL – Velocidade curvilínea; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilinearidade; LIN – Linearidade.

Tabela 11: Resumo da análise de variância da morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 20% de gema de ovo (GGL20), Glicina-Gema-Leite com 15% de gema de ovo (GGL15), Glicina-Gema-Leite com 10% de gema de ovo (GGL10) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5).

PARÂMETRO	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
ACROS (%)	Tratamentos	3	3,453	3,2687	0,0409
	Blocos	7	12,322	11,6632	<0,0001
	Erro	21	1,057		
CAUDA (%)	Tratamentos	3	4,300	3,7033	0,0273
	Blocos	7	3,996	3,4420	0,0130
	Erro	21	1,161		
IMB (%)	Tratamentos	3	80,778	3,9363	0,0222
	Blocos	7	297,158	14,4803	<0,0001
	Erro	21	20,522		

- **Morfologia espermática – ACROS** – acrossomos íntegros e **CAUDA** – caudas dobradas;
- **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente.

14. ANEXO III

TABELA 12: Resumo da análise de variância da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado do sêmen ovino refrigerado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox[®] (GGL5_{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5_{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo e suplementado com Glutathione (GGL5_{GLU}).

PARÂMETRO	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
MT (%)	Tratamentos	3	37,130	6,4241	0,0079
	Blocos	4	56,440	9,7652	0,0013
	Erro	12	5,780		
MP (%)	Tratamentos	3	30,832	6,9946	0,0059
	Blocos	4	50,073	11,3595	0,0007
	Erro	12	4,408		
VAP (µm/s)	Tratamentos	3	317,616	7,2723	0,0052
	Blocos	4	595,823	13,6423	0,0004
	Erro	12	43,675		
VSL (µm/s)	Tratamentos	3	224,928	5,7391	0,0114
	Blocos	4	539,782	13,7727	0,0004
	Erro	12	39,192		
VCL (µm/s)	Tratamentos	3	164,604	1,5277	0,2574
	Blocos	4	506,469	4,7006	0,0163
	Erro	12	107,746		
ALH (µm)	Tratamentos	3	0,256	5,1800	0,0158
	Blocos	4	0,198	4,0141	0,0270
	Erro	12	0,049		
BCF (Hz)	Tratamentos	3	3,581	2,1253	0,1498
	Blocos	4	12,416	7,3695	0,0034
	Erro	12	1,685		
STR (%)	Tratamentos	3	6,209	2,2737	0,1317
	Blocos	4	1,130	0,4139	0,7967
	Erro	12	2,731		
LIN (%)	Tratamentos	3	6,464	3,2363	0,0600
	Blocos	4	14,174	7,0959	0,0039
	Erro	12	1,997		

▪ **Análise computadorizada (CASA)** – MT – Percentual de motilidade total; MP – Percentual de motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva ; VCL – Velocidade curvilínea; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilínea; LIN – Linearidade.

TABELA 13: Resumo da análise de variância da morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas do sêmen ovino refrigerado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox® (GGL5_{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5_{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo e suplementado com Glutathione (GGL5_{GSH}).

PARÂMETRO	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
ACROS (%)	Tratamentos	3	0,267	1,0358	0,4130
	Blocos	4	0,917	3,5608	0,0386
	Erro	12	0,257		
CAUDA (%)	Tratamentos	3	0,020	0,0334	0,9910
	Blocos	4	0,231	0,3789	0,8202
	Erro	12	0,608		
IMB (%)	Tratamentos	3	28,778	1,8450	0,1922
	Blocos	4	23,463	1,5042	0,2618
	Erro	12	15,598		

- **Morfologia espermática – ACROS** – acrossomos íntegros e **CAUDA** – caudas dobradas;
- **IMB** – integridade total das membranas espermáticas em microscopia epifluorescente.

TABELA 14: Resumo da análise de variância da cinética espermática avaliada no sistema computadorizado do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox[®] (GGL5_{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5_{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo e suplementado com Glutathione (GGL5_{GSH}).

PARÂMETRO	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
MT (%)	Tratamentos	3	28,064	0,9365	0,5449
	Blocos	4	240,578	8,0280	0,0025
	Erro	12	29,967		
MP (%)	Tratamentos	3	46,968	2,0554	0,1593
	Blocos	4	103,804	4,5427	0,0182
	Erro	12	22,851		
VAP (µm/s)	Tratamentos	3	286,010	3,6996	0,0424
	Blocos	4	340,842	4,4088	0,0201
	Erro	12	77,309		
VSL (µm/s)	Tratamentos	3	333,191	6,5356	0,0074
	Blocos	4	332,433	6,5207	0,0053
	Erro	12	50,981		
VCL (µm/s)	Tratamentos	3	398,463	1,7643	0,2068
	Blocos	4	951,835	4,2144	0,0232
	Erro	12	225,850		
ALH (µm)	Tratamentos	3	0,419	3,9411	0,0357
	Blocos	4	1,293	12,1545	0,0006
	Erro	12	0,106		
BCF (Hz)	Tratamentos	3	3,320	1,1771	0,3598
	Blocos	4	6,1963	2,4685	0,1008
	Erro	12	2,821		
STR (%)	Tratamentos	3	15,399	3,5765	0,0464
	Blocos	4	7,730	1,7954	0,1942
	Erro	12	4,305		
LIN (%)	Tratamentos	3	27,237	8,9842	0,0025
	Blocos	4	23,526	7,7599	0,0029
	Erro	12	3,032		

▪ **Análise computadorizada (CASA)** – MT – Percentual de motilidade total; MP – Percentual de motilidade progressiva; VAP – velocidade de trajeto; VSL – Velocidade progressiva ; VCL – Velocidade curvilínea; ALH – Amplitude lateral da cabeça; BCF – Frequência de batimento; STR – Retilinearidade; LIN – Linearidade.

TABELA 15: Resumo da análise de variância da morfologia espermática do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox® (GGL5_{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5_{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo e suplementado com Glutathione (GGL5_{GSH}).

PARÂMETRO	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
ACROS (%)	Tratamentos	3	0,367	1,0058	0,4000
	Blocos	4	0,828	3,2608	0,0456
	Erro	12	0,187		
CAUDA (%)	Tratamentos	3	0,080	0,1456	0,9299
	Blocos	4	0,702	1,2841	0,3299
	Erro	12	0,547		

▪ **Morfologia espermática – ACROS** – acrossomos íntegros e **CAUDA** – caudas dobradas;

TABELA 16: Resumo da análise de variância da morfologia espermática e integridade total de membranas espermáticas por citometria de fluxo do sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox® (GGL5_{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5_{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo e suplementado com Glutathione (GGL5_{GSH}).

PARÂMETRO	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
CAT 1	Tratamentos	3	11,779	2,0138	0,1652
	Blocos	4	128,154	21,9094	<0,0001
	Erro	12	5,849		
CAT 2	Tratamentos	3	104,422	10,2434	0,0016
	Blocos	4	305,601	29,9785	<0,0001
	Erro	12	10,194		
CAT 3	Tratamentos	3	76,020	12,1860	0,0009
	Blocos	4	320,666	51,4030	<0,0001
	Erro	12	6,238		
CAT 4	Tratamentos	3	2,704	2,0679	0,1575
	Blocos	4	1,238	0,9468	0,5282
	Erro	12	1,308		

▪ **CAT 1** – Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida;
 ▪ **CAT 2** – Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida;
 ▪ **CAT 3** - Membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida;
 ▪ **CAT 4** - Membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida.

TABELA 17: Resumo da análise de variância das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no sêmen ovino congelado nos diluidores Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo (GGL5), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Trolox® (GGL5_{TRO}), Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo suplementado com Catalase (GGL5_{CAT}) e Glicina-Gema-Leite com 5% de gema de ovo e suplementado com Glutathione (GGL5_{GSH}).

PARÂMETRO	Causas de Variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	Valor de P
LPO espontânea	Tratamentos	3	0,097	0,9658	0,5577
	Blocos	4	1,321	13,1401	0,0004
	Erro	12	0,101		
LPO catalisada	Tratamentos	3	2,071	15,7869	0,0004
	Blocos	4	2,396	18,2697	0,0001
	Erro	12	0,131		

- **LPO espontânea** – Lipoperoxidação espontânea do sêmen criopreservado
- **LPO catalisada** – Lipoperoxidação catalisada, contendo sêmen criopreservado + sulfato ferroso + ascorbato de sódio.

15. ANEXO IV

15.1. Dados da calibração para determinar as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

CALIBRATION REPORT

Calibration Time: Tuesday, February 02, 2010 10:44 AM E.
South America Standard Time

User Full Name :

Component Name: TBARS
Component Units: mM

Calibration: Calibration Curve - Linear
($y=a_1x+a_0$)

Baseline Correction: None

Settings (nm): Position:532.00

Force through Zero: No

Calibration Coefficients :

$a_0 = 0.204587$
 $a_1 = 0.135072$

Specified Correlation Coefficient: 0,98
Calculated Correlation Coefficient: 0,99818

Index	StandardID	Specified	Calculated	Residual
1	P1	1.0000	0.4034	0.5966
2	P2	2.0000	1.8982	0.1018
3	P3	4.0000	4.1661	-0.1661
4	P4	6.0000	6.2770	-0.2770
5	P5	8.0000	8.2629	-0.2629
6	P6	10.0000	10.1204	-0.1204
7	P7	15.0000	15.4547	-0.4547
8	P8	20.0000	19.4173	0.5827

15.2. Curva padrão de MDA (malonaldeído bis dimetil acetal)