KAREN MASCARO GONÇALVES DA SILVA

EFEITO DA ESTACIONALIDADE E DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM ALGUMAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS EM EQÜINO

RECIFE- PERNAMBUCO

Fevereiro/2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

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

EFEITO DA ESTACIONALIDADE E DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM ALGUMAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS EM EQÜINOS

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

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra

RECIFE-PERNAMBUCO

Fevereiro/2007

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

S586e Silva, Karen Mascaro Gonçalves da
Efeito da estacionalidade e da adição de antioxidantes em algumas características espermáticas em eqüino/ Karen Mascaro Gonçalves da Silva. -- 2007.
90 f. : il.

Orientadora : Maria Madalena Pessoa Guerra
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia

CDD 636. 108 24

1. Reprodução
2. Congelação de sêmen
3. Proteínas de membrana
4. Antioxidantes
5. Estação do ano
6. Eqüino
I. Guerra, Maria Madalena Pessoa
II. Título

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

EFEITO DA ESTACIONALIDADE E DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM ALGUMAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS EM EQÜINOS

Tese de Doutorado elaborada por

KAREN MASCARO GONÇALVES DA SILVA

Aprovada em 26/02/2007

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof Dr[a]. Maria Madalena Pessoa Guerra/UFRPE
Orientadora

_____

Prof. Dr. Marc Roger Jean Marry Henry/UFMG

_____

Prof. Dr Rômulo José Vieira/UFPI

_____

Prof Dr[a]. Ana Lúcia Figueiredo Porto/ UFRPE

_____

Dr. Gustavo Ferrer Carneiro/Caroatá

_____

Prof. Dr. José Lima Filho/UFPE

Dedico

aos meus pais, Carlos e Lourena,

e meus irmãos, Carlos e Christiano,

que sempre caminharam ao meu lado,

auxiliando e dando o apoio necessário

para meu crescimento.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por colocar as dificuldades em meu caminho, fazendo-me crer que sou capaz de superá-las, crescendo a cada superação e mostrando que isso só é possível quando temos pessoas especiais ao nosso lado.

Aos pais, *Carlos* e *Lourena*, pelo incentivo, carinho e por estarem sempre ao meu lado, acreditando nos meus sonhos, não permitindo que desistisse frente às dificuldades. Agradeço pelo amor de vocês.

Aos irmãos, *Carlos* e *Christiano*, e cunhadas, *Lydia* e *Rosane*, pela compreensão da minha ausência e ajuda nos momentos de dificuldade. É bom saber que estão sempre por perto.

A *Lúcia Melo*, pelo carinho e grande amizade. Sempre paciente e calma, com palavras de conforto.

Aos meus familiares pelo grande apoio, em especial minha tia *Terezinha Carvalho* e meu primo, *Caron Magalhães de Carvalho*, pelo carinho e paciência durante mais essa etapa da minha vida.

À minha Orientadora, *Prof*ª. *Dr*ª. *Maria Madalena Pessoa Guerra*, agradeço a oportunidade de trabalhar em sua equipe, onde pude adquirir novos conhecimentos. Devo a você a chance de viajar para Portugal e, com isso, ter uma visão mais ampla da Medicina Veterinária, assim como amadurecimento pessoal. Ainda pelo carinho que é comum a todos que estão a sua volta, sempre nos tratando com respeito e dedicação. Agradeço também pela amizade.

À *Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto*, pela amizade, colaboração no trabalho e pela oportunidade de abrir novos conhecimentos e oportunidades na Medicina Veterinária.

Ao *Prof. Dr. João Ramalho Santos*, pela oportunidade de participar de sua equipe na Universidade de Coimbra, onde aprendi muito e contribuiu para meu crescimento profissional.

À nova amiga *Sandra Cristina Gamboa* por ceder sua paciência, conhecimentos e família, não me deixando sentir tanto a falta dos meus, apesar de estar a um oceano de distância, e às queridas *Fernanda* e *Carlota*, pelo carinho e amizade.

A todos que fazem parte do *Androlab/Uiversidade Federal Rural de Pernambuco* e *Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami/Universidade Federal de Pernambuco*, pela amizade e colaboração.

À Médica Veterinária *Ana Emília Mota*, por tão gentilmente ceder seus animais e propriedade para realização desse trabalho.

Aos "meninos e meninas" *Tânia Resende*, *Ângela e Paulo Salgado*, *Nadja Japiassu*, agradecimento imenso pela amizade, carinho e força prestados a mim durante essa jornada e, em especial, a *Hilton Resende* (*in memorian*), um grande amigo que terá presença eterna no meu coração.

Às amigas-irmãs *Denise de Fátima Melo*, *Cecília Leite Kastner* e *Ana Rita Beker* agradeço a amizade, paciência, carinho e presença, sempre dando força e me fazendo acreditar que "dias melhores virão".

A *Ana Lydia Vasco de Albuquerque Peixoto*, por me ceder artigos e seu escasso tempo para que eu conseguisse realizar esse trabalho, e das palavras de conforto nos momentos em que eu achava que não iria suportar as dificuldades.

Aos amigos, *Lígia Buzza* e *Diogo Câmara*, pelo apoio nos momentos difíceis, prontos a me ajudarem no que fosse preciso.

A *Maria da Conceição Gomes Leitão*, imenso agradecimento pela sua dedicação e ajuda em me ensinar a trabalhar com eletroforese bidimensional.

Aos funcionários da Área de Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, *Joana, Alcir e D. Sônia*, pela amizade e ajuda no decorrer dos experimentos.

A *Capes* e *CNPq* pelo suporte financeiro.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

RESUMO

Para avaliar o efeito da estação do ano na qualidade espermática do sêmen eqüino e uso de antioxidantes na diluição antes e depois da congelação, foram realizados três experimentos. No Exp. 1, colheu-se amostras de sêmen de três garanhões da raça Mangalarga Marchador, na estação reprodutiva (ER) e estação não reprodutiva (ENR), as quais foram congeladas em máquina de congelação utilizando o diluidor comercial FR5 (Tris-gema com glicerol a 5%). Após descongelação a 37 ^{o}C por 30 segundos, as amostras foram avaliadas quanto a volume (Vo), concentração (Co), motilidades total (MT) e progressiva (MP), vigor (V), acrossoma (Aci) e DNA (DNAi) íntegros, na ER e ENR, assim como proteínas de membrana espermática do sêmen *in natura*. O Vo e a Co na ENR foram maiores do que na ER. A MT e MP no sêmen *in natura* colhidos na ER foram superiores ($P<0,05$) àqueles da ENR. No sêmen descongelado, não se constatou diferença significativa entre as estações do ano. Da mesma forma, o V do sêmen *in natura* foi superior ($P<0,05$) nas amostras colhidas na ER. Após a descongelação, não houve variação significativa e os valores foram inferiores àqueles evidenciados *in natura*. Não houve diferença significativa para Aci, apresentando porcentual médio no sêmen descongelado semelhante ao *in natura*, nas duas estações, assim como na avaliação do DNA. Foram encontrados 33 e 46 pontos protéicos no sêmen *in natura* na ER e ENR, respectivamente, referentes às proteínas de membrana espermática do *pool* de sêmen de cada garanhão. A maioria das proteínas de 97 a 36 kDa estiveram presentes apenas na ENR. Observou-se também que os pontos protéicos de membrana dos três garanhões concentraram-se entre os pontos isoelétricos 4 e 6. No Exp. 2, analisou-se o efeito da ação de antioxidantes ao diluidor de congelação INRA82-HEPES, sendo utilizados animais de raças distintas classificados como férteis e subférteis. Utilizou-se INRA82-HEPES sem antioxidantes (T1), acrescido de 120 mM de Trolox (T2) ou 2mM de Piruvato (T3). As amostras descongeladas foram avaliadas quanto a MP, integridade de membrana (Mi), Ai e DNAi, estabilidade membranar (EM) e potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) logo após a descongelação. Observou-se que os animais férteis apresentaram superioridade nas MT e MP em relação aos animais sub-férteis, independente da adição de antioxidante. Ao se comparar os parâmetros espermáticos dos garanhões, de acordo com a fertilidade e a adição de substâncias antioxidantes, constatou-se que a adição do Piruvato proporcionou resultados superiores ($P<0,05$) àqueles obtidos com Trolox na MT. No Exp. 3, avaliou-se o uso de antioxidantes após a congelação do sêmen dos mesmos garanhões do Exp. 1, usando a mesma técnica de congelação. Após descongelação, utilizaram-se os tratamentos: T1= 150 µL de sêmen + 150 µL de Tris (Controle); T2= 150 µL de sêmen + 150 µL de Tris + 120 µM/mL de Trolox; T3= 150 µL de sêmen + 150 µL de Tris + 3,5 mM de Pentoxifilina e T4= 150 µL de sêmen + 150 µL de Tris + 3,5 mM de Pentoxifilina + de 120 µM/mL Trolox, e as amostras foram analisadas aos 0, 60 e 120 minutos de incubação (37 ºC) quanto a MT, MP, Aci e DNAi. Em função do tempo de incubação das amostras verificaram-se diferenças ($P<0,05$) na MT e MP aos 120 minutos, porém na interação tratamento x tempo não foi constatada qualquer significância. Por conseguinte, julga-se que as proteínas entre 97 e 36 kDa podem ser possíveis indicadores de qualidade espermática; a adição de Piruvato melhora a motilidade total em garanhões férteis e subférteis; e a adição de Trolox ao diluente utilizado após a descongelação do sêmen equino preserva a MT e MP das células espermáticas submetidas à incubação a 37 ^{o}C durante 120 minutos.

Palavras-chave: Congelação, proteínas, estação do ano, antioxidantes, eqüino.

ABSTRACT

To evaluate the effect of the season in the sperm quality of the equine semen and the use of antioxidant substances in the extender before and after thawed, three experiments was performed. In the Exp. 1, *in natura* semen of three Mangalarga Marchador stallions, in the breeding season (BS) and not breeding station (NBS), which had been frooze in machine using commercial extender FR5 (Tris-egg yolk with glicerol 5%). After thawed at 37 ^{o}C for 30 sec., the samples had been evaluated to volume (Vo), concentration (Co), total motility (TM) and progressive motility (MP), vigor (v), acrossomal (Aci) and DNA (DNAi) integrity, in BS and NBS, as well as proteins of sperm membrane of *in natura* semen. The Vo and the Co at NBS were higher than BS. TM and PM in the *in natura* semen in the BS were higher ($P<0.05$) than those at NBS. On the thawed semen, there was no difference at BS and NBS. In the same way, the V at *in natura* semen was higher ($P<0.05$) in the samples collect at BS. After thawing, there was no significant variation and the values were lower than to those at *in natura* semen. The Aci analysis was similar on *in natura* semen at two stations. The sperm cells have intact DNA at *in natura* samples, on both seasons, with values similar on the thawed semen at BS and NBS. It was observed 33 spots on the *in natura* semen at BS and 46 spots at NBS referring to sperm membrane proteins on the semen pool of each stallion. The 36 to 97 kDa proteins were present only at BS. It was observed that the spots of membrane proteins of the three stallions were concentrated between 4 and 6 iso-electric points. On the Exp. 2, it was analysed the effect of the antioxidants on the freezing INRA82-HEPES, on stallions of different breeds classified as fertile and sub-fertile. It was used INRA82-HEPES without antioxidants (T1), supplemented with 120 mM of Trolox (T2) or 2 mM of Piruvate (T3). The thawed samples were evaluated according to PM, membrane integrity (Mi), Aci and DNAi, membrane stability (MS) and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$). It was observed that the fertile animals had higher TM and PM in relation to the subfertile animals, independent of the antioxidant addition. To comparing the sperm parameters of the stallions, in accordance with fertility and antioxidant substance addition, it was observed that the piruvate addition provided results higher ($P<0.05$) than those of Trolox in TM. In the Exp. 3, it was observed the use of antioxidants after semen thawing on the same stallions and freezing technique of Exp. 1. After thawing, it was used the treatments: T1= 150 µL of semen + 150 µL of Tris (Control); T2= 150 µL of semen + 150 µL of Tris + 120 µM/mL of Trolox; T3= 150 µL of semen + 150 µL of Tris + 3,5 mM of Pentoxyfiline; T4= 150 µL of semen + 150 µL of Tris + 3,5 mM of Pentoxyfiline + 120 µM/mL of Trolox, and the samples were analyzed at 0, 60 and 120 minutes of incubation (37 ºC) according to TM, PM, Aci and DNAi. Significant differences ($P<0.05$) was seen due to the incubation time period on TM and PM at 120 min., however no difference was seen in the treatment x time incubation interaction. Based on the results we hypothethized that proteins with molecular weights between 97 and 36 kDa can be possible fertility pointers of sperm quality; the piruvate addition improve TM of fertile and sub-fertile stallions and the Trolox addition at extender after thawing of the equine semen preserve the TM and PM of the sperm cells submitted to incubation (37 ^{o}C) during 120 minutes.

Keywords: Freezing, proteins, antioxidants, sperm viability, equine.

SUMÁRIO

		Página
1	**INTRODUÇÃO** ……...	11
2	**REVISÃO DE LITERATURA** ……..	13
2.1	**Estacionalidade reprodutiva** ……..…….....	13
2.2	**Criopreservação do sêmen** ……..	14
2.3	**Estrutura da membrana espermática** ……	16
	2.3.1 Proteínas de membrana ……	17
2.4	**Espécies de oxigênio reativo** ……...	18
2.5	**Ação de substâncias antioxidantes na proteção espermática** ……..	19
	2.5.1 Vitamina E …….....	20
	2.5.2 Piruvato de sódio…….....	21
	2.5.3 Pentoxifilina ……	22
3	**EXPERIMENTOS**……	24
3.1	**Influência da estação do ano nas proteínas de membrana plasmática relacionadas com alguns parâmetros do sêmen *in natura* de garanhões**	25
3.2	**Adição de piruvato e trolox ao diluidor utilizado para congelação de sêmen de reprodutores equinos colhido no período reprodutivo em região de clima mediterrâneo**…….....	45
3.3	**Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozóides eqüinos após descongelação.**…….....	68
4	**CONSIDERAÇÕES FINAIS**.....	81
5	**REFERÊNCIAS**	82

1. INTRODUÇÃO

O incremento da produção animal tem sido obtido através da aplicação de biotécnicas reprodutivas, como por exemplo, a criopreservação e o armazenamento do sêmen, de fundamental importância em virtude de possibilitar o maior aproveitamento de animais portadores de grande potencial zootécnico (PAPA et al., 2002). No entanto, outras metodologias são necessárias para avaliar o potencial de fertilidade das células espermáticas e predizer o sucesso da inseminação artificial.

O garanhão é um reprodutor de dias longos, apresentando ciclo reprodutivo anual nas regiões temperadas onde as estações do ano são bem definidas e com clima previsível (CLAY e CLAY, 1992). Muitos estudos relacionam a estação do ano e os parâmetros seminais dos garanhões. Embora alguns autores não tenham evidenciado variação sazonal na motilidade progressiva de espermatozóides de eqüinos (PICKETT e VOSS, 1972; PICKETT et al., 1976, 1983; HENRY et al., 1999, 2000), Gastal et al. (1997) e Janett et al. (2003) relataram variação mensal deste parâmetro durante todo o ano. Corroborando com isso, Leme et al. (2003) notaram superioridade reprodutiva desta espécie no período primavera-verão em relação ao outono-inverno, ao avaliarem a concentração do hormônio luteinizante (LH) e a morfologia do epitélio seminífero de garanhões criados na região de Botucatu/São Paulo.

O procedimento de criopreservação envolve exposição a baixas temperaturas, consideradas não fisiológicas, resultando em diminuição da fertilidade quando comparada ao sêmen fresco. Este prejuízo é decorrente da combinação de dois aspectos, redução do número de espermatozóides vivos ou danos na capacidade funcional dos espermatozóides sobreviventes (WATSON, 2000), uma vez que o espermatozóide pode ser móvel, mas estar danificado, impossibilitando a penetração e a fertilização do oócito (SALAMON e MAXWELL, 1995).

A composição da membrana espermática sofre influência direta do processo de criopreservação (WATSON, 1995), alterando o seu perfil protéico, o qual está relacionado à congelabilidade do sêmen de garanhões (FONSECA et al., 2002)

O papel de espécies de oxigênio reativo (ROS) tem sido enfatizado na fisiopatologia da reprodução e, embora esteja envolvido no controle de algumas funções espermáticas, a sua produção excessiva é prejudicial em virtude de reduzir a motilidade espermática, a capacidade de fusão dos gametas e a fertilidade (GUERRA et al., 2004).

Assim, para evitar ou controlar os danos causados pelo excesso de ROS, tem sido utilizado diluidores de sêmen contendo antioxidantes não enzimáticos como, por exemplo, Trolox (GUERRA et al., 2005), piruvato (BILODEAU et al., 2002) e pentoxifilina (GOULART et al., 2004) ou enzimáticos, como superóxido dismutase, catalase ou glutationa peroxidase (OCHSENDORF et al., 1998; YEUNG et al., 1998).

A vitamina E, antioxidante lipossolúvel animal, tem ação de proteção das células contra os radicais de oxigênio (SIKKA, 2004). Este antioxidante pode ser utilizado na forma de α-tocoferol e seus derivados (BOLLE et al., 2002) ou de seu análogo hidrossolúvel, o Trolox (PEÑA et al., 2003).

O piruvato de sódio também tem sido utilizado como substância antioxidante do sêmen (UPRETI et al., 1998), cuja função principal é captar peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, proteger a célula de danos oxidativos (NATH et al., 1995).

A adição de pentoxifilina nos meios de congelação tem sido uma boa estratégia já que esta molécula reúne características muito importantes: é um ativador da motilidade espermática (mediante a ativação da fosfodiesterase) e, ao mesmo tempo, inibe a geração de superóxido (GAVELLA et al., 1991; GAVELLA e LIPOVAC, 1992).

Por conseguinte, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da estação do ano na qualidade do espermatozóide eqüino e o uso de antioxidantes na diluição antes e depois da congelação.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estacionalidade reprodutiva

A influência da estação do ano na qualidade espermática de garanhões tem sido caracterizada por vários autores (MAGISTRINI et al., 1987; JOHNSON, 1991; CLAY e CLAY, 1992; GERLACH e AURICH, 2000; BLOTTNER et al., 2001; LEME et al., 2003; JANETT et al., 2003), onde evidenciam que a obtenção da capacidade reprodutiva máxima ocorre nos meses de primavera e verão em países com marcada diferença climática (CLAY e CLAY, 1992).

Apesar da espécie equina não sofrer, de forma mais acentuada, a variação climática em região tropical, Leme et al. (2003) trabalhando com garanhões na região de São Paulo (Brasil), verificaram que esses animais apresentaram diminuição de volume testicular, libido, concentração do LH e aumento significativo da porcentagem de células de Sertoli no período outono-inverno, demonstrando superioridade das características reprodutivas nos meses de primavera-verão.

A melatonina, hormônio sintetizado pela pineal, apresenta ligação direta com o fotoperíodo e a reprodução. A secreção diária deste hormônio no período noturno está associada ao decréscimo na liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), com subseqüente regressão das gônadas em espécies reprodutoras de dias longos, como os cavalos (GERLACH e AURICH, 2000).

Segundo Magistrini et al. (1987), comparando alguns parâmetros espermáticos de eqüinos nas várias estações do ano, maior concentração e motilidade espermática são observadas no período fora da estação reprodutiva. Estes autores relataram, ainda, que a motilidade dos espermatozóides descongelados durante este período foi significativamente maior sugerindo a influência da qualidade do plasma seminal na congelabilidade do sêmen durante o inverno.

Kaya et al. (2001) encontraram taxas elevadas de viabilidade espermática e acrossoma intacto no sêmen descongelado de carneiros que receberam implante de melatonina durante a estação de monta em relação ao grupo não tratado, assim como aumento das taxas de acrossoma íntegro e redução da atividade da enzima Aspartato aminotransferase no sêmen congelado fora da estação de monta. Reiter et al. (1998)

relataram que a capacidade antioxidante total do soro sanguíneo do homem está intimamente relacionada à concentração de melatonina e que a redução desta concentração pode indicar aumento nos porcentuais de danos oxidativos.

2.2 Criopreservação do sêmen

Para o sucesso da criopreservação dos espermatozóides do garanhão utiliza-se diluidor apropriado, e as amostras são centrifugadas (FÜRST et al., 2003; PAPA et al, 2003), envasadas na concentração adequada (100 x 10^6 espermatozóides/mL; PAPA et al., 2002), re-suspensas em diluidor contendo crioprotetores, refrigeradas e estocadas em nitrogênio líquido a –196 ^oC (SQUIRES et al., 1999). Além disso, considera-se a relação entre a quantidade de nitrogênio líquido e a distância entre as amostras de sêmen, uma vez que Papa et al. (2003) relataram que a distância de três a seis centímetros determinou maior motilidade e integridade espermática. Todos estes aspectos interferiram no resultado final da inseminação artificial, elevando a taxa de prenhez (75,0%) com sêmen congelado (PAPA et al., 2002) tanto utilizando palhetas de 0,25 quanto de 0,5 mL (HOLT, 2000).

Os agentes crioprotetores não penetrantes aumentam a osmolaridade do meio extracelular e são responsáveis pela passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo a formação de cristais de gelo durante a congelação. Estas substâncias são moléculas de alto peso molecular, como açúcares, lipoproteínas da gema de ovo, proteínas do leite e, em alguns casos, aminoácidos (AMANN e PICKETT, 1987).

Lasley e Mayer (1994) mostraram que a gema de ovo possui um fator que auxilia o espermatozóide a suportar algumas condições adversas encontradas durante o período de armazenamento, principalmente relacionada a prevenção do choque térmico. O fator de resistência presente na gema de ovo, possivelmente em associação com outras propriedades físicas e químicas, não apenas protege os espermatozóides contra as variações drásticas de temperatura, mas também contra mudanças no pH e na pressão osmótica (BOGAR e MAYER, 1950).

Os agentes crioprotetores penetrantes são substâncias ou fármacos que diminuem as lesões de origem química ou mecânica ocorridas durante a congelação (KAROW,

2001). Estas substâncias possuem estruturas que lhes permitem fazer ligações de hidrogênio com a molécula de água, diminuindo a formação de cristais de gelo, o aumento de tamanho desses cristais e a concentração de soluto nos meios extra e intracelulares (DALIMATA e GRAHAM, 1997).

Muitos compostos têm sido testados para avaliação de sua eficácia como crioprotetores. Dessa forma, o glicerol, além de açúcares como rafinose e lactose, tem sido identificado como potente crioprotetor (SALAMON e LIGHTFOOT, 1969; WILMUT e POLGE, 1977). O glicerol foi o primeiro crioprotetor a ser utilizado em sêmen e tem sido amplamente utilizado, sendo que seu efeito crioprotetor está relacionado à sua capacidade de ligação com a molécula de água e à baixa dissociação com sais, diminuindo, portanto, a osmolaridade do meio de congelação. Essas propriedades são favorecidas por sua capacidade de atravessar facilmente a membrana celular, mantendo a osmolaridade interna e externa (POLGE et al., 1949). Kundu et al. (2000) formularam a hipótese de que o mecanismo de proteção desta molécula se deve à capacidade de ligação dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila com os átomos de oxigênio dos grupos fosfato dos fosfolipídios da membrana do espermatozóide, promovendo, assim, a estabilização da membrana durante o processo de criopreservação.

A congelação em aparelho automatizado foi inicialmente descrita por Almquist e Wiggins (1973) e posteriormente estudada em maiores detalhes por Landa e Almquist (1979), os quais não evidenciaram efeito negativo deste método de criopreservação ao avaliarem o porcentual de células com acrossomas íntegros e a motilidade pós-descongelação, quando comparados com congelação em vapor de nitrogênio líquido.

Alguns estudos têm sido realizados utilizando o diluente Kenney (KENNEY et al., 1975), à temperatura ambiente, em virtude de ser eficaz na manutenção da motilidade e do vigor espermático durante duas horas para transporte de sêmen (SNOECK et al., 2003). O poder positivo deste diluente pode ser explicado pelo fato de que o mesmo possui características adequadas à preservação da célula espermática durante o transporte e a centrifugação, apresentando balanço eletrolítico e combinação de nutrientes satisfatórios, o que determina melhor proteção contra a variação de temperatura (DELL'ÁQUA JÚNIOR e PAPA, 2001).

2.3 Estrutura da membrana espermática

O processo de criopreservação exerce efeitos negativos sobre a membrana celular, particularmente vulnerável a este processo. Existem três membranas no espermatozóide: membrana plasmática, membrana acrossomal e membrana mitocondrial. Com exceção da última, as demais apresentam diferenças em domínios na estrutura e no comportamento (WATSON, 1995).

O modelo estrutural básico da membrana espermática é igual ao modelo biológico clássico formado por duas camadas de fosfolipídios com proteínas integrais e glicoproteínas de superfície de ligação e glicolipídios organizados em um mosaico fluido (SINGER e NICHOLSON, 1972). Dependendo da região espermática, essa membrana apresenta-se compartimentalizada, exibindo propriedades físicas e químicas diferentes (SQUIRES et al., 1999).

As membranas espermáticas apresentam-se em um estado de fluidez, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções, pois permite a movimentação livre dos componentes através da membrana. Com a contínua redução de temperatura durante a congelação, ocorrem mudanças que produzem alterações físicas da membrana, passando do estado líquido a gel, onde as cadeias de ácidos graxos, que se encontravam aleatoriamente distribuídas, ordenam-se paralelamente produzindo uma estrutura rígida, tornando estas áreas fracas e susceptíveis a rupturas e permeáveis a íons (HAMMERSTED et al., 1990; WOLF et al., 1998).

Quando submetida à temperatura abaixo do ponto de congelação, cristais de gelo são formados fora da célula, aumentando a pressão osmótica extracelular em virtude da concentração de solutos na água não congelada (WATSON, 2000). A exposição dessas células a soluções hiperosmóticas, antes da congelação, determina a saída de água intracelular e, conseqüentemente, a desidratação da célula seguida de influxo de íons (MAZUR, 1984). No entanto, a descongelação promove efeito inverso, onde se observa que a entrada de grande fluxo de água causa rompimento da membrana (MAZUR et al., 1970).

2.3.1 Proteínas de membrana

Dentro do lúmen epididimário, a P25b está associada a pequenas vesículas membranosas chamadas de epididimossomos (FRENETTE e SULLIVAN, 2001). Muitas proteínas diferentes estão associadas aos epididimossomos e algumas delas são seletivamente transferidas a domínios membranosos específicos de maturação espermática, dependendo do pH, da temperatura e da concentração de zinco (FRENETTE et al., 2002). Estas proteínas, especialmente aquelas envolvidas no reconhecimento da zona pelúcida, podem ser usadas para avaliar a eficiência do processo de maturação espermática que ocorre no epidídimo e como marcador da fertilidade masculina (SULLIVAN, 2004).

A hialuronidase espermática tem sido implicada na sua capacidade de penetrar o *cumulus oophorus*, sendo fundamental na fertilidade de mamíferos. O extrato de membrana plasmática dos espermatozóides de garanhão apresentou três bandas protéicas com potente atividade hialuronidase, correspondendo a 54, 59 e 83 kDa. Este estudo sugeriu que proteínas específicas localizadas na membrana espermática da cabeça do gameta masculino desenvolvem essa atividade redistribuindo-se sobre a região acrossomal durante o processo de capacitação espermática (MEYERS e ROSENBERGER, 1999).

Fonseca et al. (2002), comparando o perfil protéico de sêmen *in natura* e descongelado de três garanhões, relataram que proteínas de peso molecular de 66,90 kDa, encontradas no sêmen congelado de um dos garanhões, apresentaram-se em maior concentração quando comparadas àquelas do mesmo ejaculado *in natura*. Na análise do perfil protéico do sêmen do outro garanhão não foi observado aumento significativo dessas proteínas. Neste animal, a concentração das proteínas de membrana encontradas em amostras de sêmen congelado foi inferior àquela constatada no sêmen *in natura*. Os autores relataram que talvez este diferente comportamento do perfil protéico esteja relacionado à melhor congelabilidade do sêmen do garanhão.

Estudo com membrana de espermatozóides bovinos no sêmen fresco, diluído e pós-congelação, verificou que existe alteração expressiva na composição protéica da membrana dos espermatozóides frente aos diferentes estágios de processamento e manipulação do sêmen, condição necessária para a criopreservação (RONCOLETTA et

al., 1999). Esse autor evidenciou ainda que as proteínas de peso molecular 95, 58, 54, 45 e 36 kDa apresentaram resultados de densitometria significativamente diferentes entre os grupos com variados graus de congelabilidade do sêmen, corroborando com a hipótese de que estas proteínas podem participar do metabolismo espermático durante a criopreservação.

A eletroforese bidimensional consiste na separação de proteínas e polipeptídios com base em suas diferentes propriedades moleculares em duas dimensões: na primeira dimensão, a focalização isoelétrica (FIE) separa as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI) em gradientes de pH imobilizados (IPGs); na segunda dimensão, realizada em gel de poliacrilamida, separa as proteínas de acordo com seus pesos moleculares (O´FARREL, 1975; GARRELS, 1979; BRAVO et al., 1984). Esta técnica tem sido utilizada e pode contribuir para análise precisa dos componentes de complexos protéicos purificados de membranas (KASHINO, 2003), já reportada na caracterização protéica de membrana espermática de homens (RAJEEV e REDDY, 2004) e touros (RONCOLETTA et al., 2006).

2.4 Espécies de oxigênio reativo (ROS)

Todas as células que vivem sob condições aeróbicas necessitam do oxigênio para dar suporte à vida, mas seus metabólitos (ROS) podem modificar as funções celulares, colocar em perigo a sobrevida celular, ou ambos (De LAMIRANDE e GAGNON, 1995).

O espermatozóide sofre capacitação para adquirir habilidade de fertilizar. As ROS, como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico, estão envolvidas nesse processo (O´FLAHERTY, 2006). A peroxidação lipídica resultante da baixa concentração de ROS promove ligação do espermatozóide à zona pelúcida e pode iniciar a liberação dos ácidos graxos não esterificados da membrana plasmática (De LAMIRANDE et al., 1997). Por isso, diz-se que as ROS possuem efeito deletério ou benéfico na função espermática, dependendo da natureza e da concentração de ROS envolvido no sêmen, assim como do momento e da localização de sua exposição.

O balanço entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante desempenha um papel crítico na fisiopatologia das doenças. Os espermatozóides de mamíferos são muito

susceptíveis ao dano induzido pelas ROS, o qual é mediado pela peroxidação lipídica. Em situação normal, o mecanismo antioxidante presente nos tecidos reprodutivos e em suas secreções é requerido para acabar com a ação das ROS e proteger contra danos oxidativos em células gonadais e espermatozóides maduros (SIKKA, 2001).

As células espermáticas são particularmente susceptíveis ao dano induzido pelo excesso de ROS em virtude de sua membrana plasmática possuir quantidades elevadas de ácidos graxos polinsaturados (ALVAREZ e STOREY, 1995) e seu citoplasma apresentar concentrações reduzidas de enzimas captadoras de elétrons desemparelhados (De LAMIRANDE e GAGNON, 1995). A elevada concentração de ROS, como por exemplo na congelação/descongelação induz a peroxidação lipídica através da iniciação de uma reação em cadeia na membrana, seguida de propagação de danos através da célula (AITKEN e FISHER, 1994; SHARMA et al., 1996).

Baumber et al. (2000) relataram que o peróxido de hidrogênio possui papel importante na mediação de danos ao espermatozóide equino, como consequência do aumento da produção de ROS, e que a motilidade espermática nesta espécie é indicador mais sensitivo de estresse oxidativo do que a avaliação da viabilidade, integridade do acrossoma, peroxidação lipídica e do potencial mitocondrial. Os resultados obtidos por estes autores sugerem, também, que a motilidade espermática pode ser afetada por um mecanismo de ação de ROS independente da peroxidação lipídica e da função dependente da membrana mitocondrial.

2.5 Ação de substâncias antioxidantes na proteção espermática

Em condições normais, os mecanismos antioxidativos celulares, presentes em quase todos os tecidos e suas secreções, são responsáveis por inibir a elevada produção de ROS, protegendo as células de danos oxidativos (JONES et al., 1979). No entanto, enzimas antioxidantes intracelulares não conferem proteção total à membrana plasmática que envolve o acrossoma e a cauda, forçando os espermatozóides a suplementarem essa limitada defesa intrínseca com a proteção conferida pelo plasma seminal (ALVAREZ e STOREY, 1989; ZINI et al., 1993; SALEH e AGARWAL, 2002).

Os antioxidantes presentes no plasma seminal normalmente (vitaminas E e C, catalase, superoxido dismutase, taurina) ajudam a proteger o espermatozóide dos danos oxidativos. Desta forma, os procedimentos de lavagem do sêmen podem remover esta capacidade protetora, (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A aplicação de inibidores de ROS (superóxido dismutase, catalase e vitamina E) aumenta a motilidade e a função espermática, melhorando as técnicas de reprodução assistida (ZINI et al., 1993). Os efeitos benéficos dos antioxidantes fornecem evidência indireta de que o estresse oxidativo ocorre durante o processo de criopreservação (CHATTERJEE e GAGNON, 2001).

2.5.1 Vitamina E

A vitamina E (α-tocoferol e seus derivados) é o maior antioxidante encontrado no plasma seminal, cuja função é interromper a cadeia de formação de ROS (BOLLE et al., 2002). Esta vitamina protege as células de radicais de oxigênio, *in vivo* e *in vitro.* Acredita-se que a vitamina E seja o inibidor primário de radicais livres encontrados em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos e no plasma seminal (SIKKA, 2004), protegendo as células de estresse oxidativo (KAGAN et al., 1992) e de danos da membrana e do DNA (SIKKA, 2004).

A molécula da vitamina E é dividida em duas partes: um anel cromanol (hidrofílico) e uma cadeia de hidrocarboneto (hidrofóbica), que serve para ancorá-la na membrana lipídica. O grupo –OH presente no anel cromanol é o responsável por sua propriedade antioxidante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). O α-tocoferol é a forma mais abundante da vitamina E na natureza e a que possui maior atividade biológica (BRIGELIUS-FLOHÉ e TRABER, 1999).

Testando o efeito das vitaminas C e E (Trolox – análogo hidrossolúvel do α-tocoferol), na viabilidade de espermatozóides ovinos, Guerra et al. (2005) evidenciaram que a adição desses antioxidantes (2400μM e 600μM, respectivamente) determinou maior porcentual de gametas com motilidade progressiva, reduzindo o efeito negativo da diluição, coloração com Hoechst 33342 e congelação. Todavia, Peña et al. (2003) relataram que tanto a motilidade quanto o potencial de membrana mitocondrial foi

melhorada pela presença do Trolox. A citotoxidade induzida pela irradiação UV foi reduzida significativamente pelo uso do Trolox, quando comparada ao α-tocoferol, e seu efeito protetor no promielócito leucêmico humano HL-60 pode ter como causa a inibição da oxidação da metionina (SATOH et al., 1997).

Devido à sua estrutura cromanol que lhe confere atividade antioxidante e ao grupo carboxila que tem efeito hidrossolúvel moderado, o Trolox é distribuído em ambas as fases da bicamada de lipídios das biomembranas, tornando-se excelente protetor contra a lipoperoxidação (BARCLAY et al., 1995).

2.5.2 Piruvato de Sódio

O piruvato de sódio é um substrato energético efetivo que pode mover-se livremente dentro do citoplasma e da mitocôndria das células (BRUEMMER et al., 2002). Tem sido relatado que, em concentrações elevadas, esta substância age como antioxidante em espermatozóides de carneiros (UPRETI et al., 1998). O primeiro pesquisador a reportar que o piruvato de sódio captura peróxido de hidrogênio, promovendo proteção contra dano oxidativo, foi Holleman (1904), evidenciando que o piruvato reage com o H_2O_2 produzindo o ácido carboxílico, água e dióxido de carbono (NATH et al., 1995).

Bilodeau et al. (2002) investigando a propriedade antioxidante do piruvato ou sua habilidade de regenerar as concentrações de ATP, verificaram que, na ausência do H_2O_2, 1mM de piruvato após 6 horas de incubação preserva a motilidade espermática quando comparada ao grupo controle, e que na concentração de 5 mM, os níveis de ATP intracelular foram significativamente superiores, obtendo maiores porcentuais de células móveis submetidas a estresse oxidativo do que ao utilizarem 1mM desta substância.

De acordo com Fabbrocine et al. (2000), o piruvato pode ser utilizado como substrato energético para ajudar os espermatozóides a superar o estresse decorrente do processos de congelação/descongelação, recomendando seu uso principalmente na descongelação. Enquanto Bruemmer et al. (2002) relataram que a adição do piruvato ao diluente para espermatozóide de garanhão mantido a 5 ^{o}C preservou mais a motilidade espermática do que ao utilizarem diluentes sem piruvato, e que a adição de 2 mM desta

substância foi mais eficaz do que 5 mM na manutenção da motilidade desses espermatozóides.

2.5.3 Pentoxifilina

A pentoxifilina é uma metilxantina derivada de um agente hemorrágico geralmente usada em tratamento de desordem vascular periférica, mas quando utilizada no sêmen, age como inibidor da fosfodiesterase, podendo aumentar as concentrações intracelulares do AMPc e preservar a motilidade (SHEN et al., 1991; STACHECKI et al., 1994), uma vez que a maioria das proteínaquinases dependentes de AMPc, em ratos, está localizada dentro do flagelo (MacLOAD et al., 1991). O AMPc interfere na indução da motilidade flagelar através da fosforilação protéica, liberando energia para dar início à atividade da dineína ATPase, responsável pela movimentação flagelar do espermatozóide (PERRAULT et al., 1992; VIJAYRAGHAVAV et al., 1996). Para aumentar a AMPc, a pentoxifilina atua inibindo a fosfodiesterase e ativando a adenilciclase, com efeitos diretos no controle flagelar do espermatozóide (MANETTA, 1997; SABERWALL et al., 2002).

Blanes et al. (2004), trabalhando com concentrações de 1, 5, 10 e 50 mM de pentoxifilina, relataram que o feito deletério da congelação sobre a motilidade espermática humana pode ser evitado, ao menos parcialmente, ao se adicionar 1mM de pentoxifilina ao meio de congelação. Este resultado, segundo os autores, é perfeitamente coerente com o mecanismo duplo de atuação da pentoxifilina: reduzir a produção de ânion superóxido em baixas concentrações, e estimular a ocorrência da motilidade hiperativada. Nassar et al. (1998) relatam também que a pentoxifilina adicionada ao sêmen aumentou significativamente a motilidade espermática e o porcentual de células com acrossoma reagido de homens férteis submetidos a condições capacitantes, e que esse efeito ocorreu apesar do decréscimo da concentração de Ca^{2+}, ratificando que seu efeito estimulador da motilidade é decorrente do aumento da concentração de AMPc.

Goulart et al. (2004), avaliando os efeitos da pentoxifilina (3,6 mM) sobre a viabilidade dos espermatozóides de equinos através do sistema computadorizado CASA após a refrigeração a 5 ^{o}C, verificaram que esta droga melhora significativamente as características do sêmen. Enquanto Marques et al. (2002) observaram que a motilidade

progressiva do sêmen criopreservado de eqüino aumentou ao se utilizar pentoxifilina (3,5 mM), associada ou não com o ácido ascórbico após 0 ou 120 minutos de incubação *in vitro*, pós-descongelação.

3 EXPERIMENTOS

3.1 Influência da estação do ano nas proteínas de membrana plasmática relacionadas com alguns parâmetros do sêmen *in natura* de garanhões

(Seasonal influence of plasmatic membrane proteins related with some parameters of stallion in natura semen)

K.M.G. Silva[a1], M.C.G. Leitão[b,c], M.E.C. Chaves[c], J.L. Lima-Filho[c], A.L. Porto[a,c], M.M.P. Guerra[a]

[a]*Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;*

[b]*Curso de Doutorado em Biotecnologia RENORBIO, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;*

[c]*Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami – Lika/UFPE.*

Resumo

Objetivou-se avaliar a influência da estação do ano nas proteínas de membrana plasmática relacionadas com alguns parâmetros do sêmen *in natura* de garanhões e na qualidade do sêmen descongelado. Utilizou-se o diluidor Tris-gema de ovo com %5 de glicerol em máquina de congelação de sêmen, e para descongelação, duas palhetas de sêmen de cada reprodutor foram colocadas a 37 ºC, durante 30 segundos. Amostras de sêmen, pré e pós-congelação nas duas estações reprodutivas, foram analisadas quanto a motilidades total (MT) e progressiva (MP), vigor (V), integridade acrossomal (iAc) e DNA (iDNA), além de volume (Vo) e concentração (Co). Os *pellets* do sêmen *in natura* foram processados para retirada das proteínas de membrana e avaliados utilizando eletroforese bidimensional (2-D). O Vo e a Co no verão foram maiores do que no inverno. Os valores de MT e MP e V do sêmen *in natura* colhidos no verão foram superiores (P<0,05) àqueles observados no inverno. No sêmen descongelado, não se constatou diferença significativa entre as estações do ano em nenhum parâmetro avaliado, porém os valores encontrados foram inferiores àqueles evidenciados no sêmen *in natura*. A análise da iAc apresentou porcentual médio no sêmen descongelado semelhante ao sêmen *in natura* nas duas estações avaliadas assim como para a iDNA. Foram encontrados 33 pontos de proteína (Pp) no sêmen *in natura* no verão e 46 Pp no inverno, referentes às proteínas de membrana espermática do *pool* de sêmen de cada garanhão. Os Pp entre 97 e 36 kDa estiveram presentes apenas no inverno. Foi observado também que os Pp das proteínas de membrana dos três garanhões concentraram-se entre os pontos isoelétricos 4-6. Por conseguinte, supõe-se que as

[1] Av Boa Viagem, 5554/602, Boa Viagem, Recife-PE, CEP: 51030-000. Tel.: 55-81-34620452; E-mail: karenmascaro1@hotmail.com (K.M.G. Silva)

proteínas com peso molecular entre 97 e 36 kDa podem indicar baixa qualidade espermática.
Palavras-chave: Eqüino, estação do ano, proteínas, membrana plasmática.

Abstract

It was objectified to evaluate the influence of the year season on the membrane proteins related with semen freezability of stallions. To freezing, it was used FR5 extender in machine of semen congelation. For thawing, two straws of each male were placed at 37 ºC, during 30 seconds. Semen samples, before and after freezing in two breeding season, were evaluated according to total (TM) and progressive (PM) motility, vigor (V), acrosomal (Ai) and DNA (DNAi) integrity, besides volume (Vo) and concentration (Co). Sperm pellets were processed to bidimensional analyses of membrane proteins and evaluated using electrophoreses (2-D). Vo and Co at Summer were higher than at winter. The values of TM and PM in the *in natura* semen harvested at summer were higher ($P<0.05$) than those harvested at winter. In the thawed semen, there was no significant difference between seasons. In the same way, the Vi of *in natura* semen was higher ($P<0.05$) in the samples harvested at Summer. After thawing there was no significant variation between season at none parameters, however it was lower then *in natura* semen. The Ai analysis was similar to thawed and *in natura* semen on the two seasons as DNAi was. It was observed 33 spots on the *in natura* semen at winter and 46 spots at summer, referring to sperm membrane proteins on the semen pool of each stallions. The spots between 97 and 36 kDa were present only at winter. It was observed that the spots of membrane protein were at 4-6 isoeletric point. Because of that, it was suposed that proteins at 97 and 36 kDa ware indicated poor sperm quality.

Keywords: Equine, season, protein, plasmatic membrane.

1 Introdução

Reprodutores estacionais são aqueles animais que possuem a capacidade reprodutiva máxima nos dias longos (verão) como, por exemplo, os cavalos (CLAY e CLAY, 1992). A atividade reprodutiva anual é regulada por um ritmo endógeno sincronizado com o ano geofísico através de estímulo ambiental (fotoperíodo). Estes estímulos são transmitidos pelo sistema neuroendócrino em sinais hormonais que regulam a atividade gonadal (ROBINSON e KARSCH, 1987; GORMAN e ZUCKER, 1995).

Apesar da espécie eqüina não sofrer, de forma mais acentuada, a variação climática em região tropical, Leme et al. (2003) trabalhando com garanhões no Brasil, verificaram que esses animais apresentaram alterações, demonstrando superioridade em algumas características reprodutivas nos meses de primavera-verão.

A membrana espermática desempenha papel crítico no reconhecimento espermatozóide-oócito, adesão e fertilização (O`RAND et al., 1979). A perda da integridade da membrana plasmática tem sido associada com infertilidade em homens, apesar dos parâmetros seminais apresentarem-se normais (WASSARMAN, 1990; BATOVA, et al., 1998). Prévios resultados demonstraram o potencial uso de marcadores protéicos como método de diferenciação de fertilidade em touros e qualidade de congelação de sêmen. A presença ou ausência de determinadas proteínas na membrana espermática pode alterar a fertilidade do sêmen de alguns desses animais (RONCOLETTA et al., 2006).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da estação do ano nas proteínas de membrana plasmática relacionadas com algumas características do sêmen *in natura* de garanhões.

2 Material e Métodos

2.1 Material

FITC-PNA (Peanut aglutinina) foi obtido da Sigma (Saint Louis, MO, USA), enquanto Laranja de Acridina foi obtido da Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA). Todos os reagentes e equipamentos para as duas dimensões de eletroforese foram adquiridos na Amersham Biociences (Califórnia, USA).

2.2 Colheita de sêmen e avaliação da qualidade espermática

Amostras de sêmen foram obtidas de três garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idades variando entre quatro e oito anos, os quais permaneceram estabulados no Haras Aparthorse (Camaragibe-PE, latitude $08^{0}01´18´´$ sul e longitude $34^{0}58´52´´$ oeste estando a uma altitude de 55 metros) durante todo o experimento (junho e julho de 2005 – inverno e janeiro de 2006 – verão), alimentados com ração comercial e feno de coast-cross. Os garanhões foram avaliados através de exame andrológico de acordo com o Manual de Exame Andrológico do Colégio Brasileiro de

Reprodução Animal (CBRA – 1998), sendo aprovados para congelação apenas os ejaculados com valores mínimos de 60,0% de motilidade total e 3,0 de vigor.

As colheitas de sêmen foram realizadas a cada três dias, totalizando três ejaculados de cada reprodutor, através do uso da vagina artificial (modelo Botucatu), com auxílio de uma égua, estando em estro apenas no período de inverno. Imediatamente após a colheita, procedeu-se à filtragem das amostras de sêmen com gaze visando remover o gel e as partículas grandes de *debris* celulares. As amostras sem gel foram mantidas a 37 ^{o}C em banho-maria durante diluição e análise da qualidade espermática: (a) volume espermático com auxílio de proveta; (b) motilidade total e motilidade progressiva avaliadas de forma subjetiva sob microscópio óptico; e (c) concentração espermática analisada em Câmara de Neubauer. Uma alíquota de sêmen *in natura* foi centrifugada e o *pellet* foi armazenado a -20^{0}C para posterior análise de eletroforese bidimensional.

Em seguida, outra alíquota de sêmen foi diluída [1:1, sêmen:diluidor (KENNEY et al., 1975)] e transportada, à temperatura ambiente, ao laboratório de Andrologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE para posterior congelação.

2.2.1 Integridade de acrossoma

Dez microlitros do sêmen *in natura* diluído em diluidor Kenney et al. (1975) e o mesmo volume da amostra descongelada foram utilizados para confecção de estiraços, os quais foram armazenados a 4 ^{o}C, protegidos da luz e analisados no prazo de duas semanas utilizando-se a técnica de coloração *FITC*-conjugada ao *Peanut* aglutinina (*FITC-PNA*, ROTH et al.1998). No momento da análise, as lâminas foram coradas com 30 μL de solução de PNA (20 μL PNA + 480 μL PBS), sendo depositada no centro da lâmina e procedendo-se à homogeneização da amostra a fim de cobrir grande extensão da lâmina. Em seguida, as lâminas foram refrigeradas (4 ºC) durante 20 minutos, mergulhadas em 50mL de PBS e colocadas no isopor para secagem em temperatura ambiente. Após secagem, alíquotas de 5 μL da solução UCD (5 mg Azida sódica, 0,5 mL PBS, 0,1 % w/v Fenilenediamina (Sigma P6001, USA), 4,5 mL Glicerol, pH 8,0) foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Germany), utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho

dicromático de 510 nm), onde foram contados 200 espermatozóides/lâmina e classificados em: a) acrossomas intactos (AI), quando a região acrossomal apresentava fluorescência verde; b) acrossomas reagidos (AR), quando apresentavam-se fluorescência verde na região equatorial da cabeça espermática.

2.2.2 Integridade de DNA

Amostras de sêmen *in natura* ou descongeladas (10µL) foram armazenadas em 990 µL de uma solução [0,877g de NaCl (0,15M); 0,1576g de TRIS-HCl (0,01M); 37,2 mg de EDTA.Na_2.$2H_2O$ (1mM); q.s.p. 100mL em pH de 7,4] a -196 ^oC para posterior avaliação da integridade de DNA espermático usando o corante Laranja de Acridina (EVENSON et al., 2002). Alíquotas (100 µL) das amostras foram descongeladas a 37 ^oC e transferidas para tubos de microcentrífuga colocados em gelo, onde foram adicionados 200 µL da solução detergente [0,1 mL Triton X-100 (0,1% v/v); 0,877g de NaCl (0,15M); 8 mL 1N HCl (0,08N)], e incubados durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 600 µL da solução de Laranja de Acridina – solução C [60 µL da solução B (1mg de Laranja de Acridina em 1 mL de água de miliQ) adicionado em 9940 µL da solução A (37 mL 0,1M ácido cítrico; 63 mL 0,2 M fosfato de sódio; 0,877 g NaCl (0,15 M) e 37,2 mg EDTA (1mM) em pH 6,0]. Após homogeneização, 200 células foram avaliadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Germany), utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm). As células coradas de verde fluorescente foram classificadas como portadoras de DNA íntegros, enquanto aquelas que emitiram fluorescência vermelha, laranja ou amarelada foram classificadas como portadoras de DNA danificado.

2.3 Congelação, descongelação e análise de sêmen

Antes do procedimento de congelação, as amostras de sêmen foram centrifugadas (600xg, durante 10 minutos) para retirada do plasma seminal e os *pellets* foram re-suspensos em diluidor de congelação FR5[2], na concentração de $100x10^6$ espermatozóides/mL. A seguir, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25mL e

[2] NUTRICELL, Brasil – Tris-gema de ovo com 5% de glicerol.

transferidas imediatamente para a máquina de congelação de sêmen (modelo Tetakon® - TK 3000, Tecnologia em Congelação Ltda), onde foram submetidas ao processo de refrigeração do sêmen iniciando à temperatura ambiente até atingir 5 ^{o}C, a uma taxa de 0,25 ^{o}C/min. A partir daí, a parte central do porta-palhetas foi colocado em nitrogênio líquido e iniciado o processo de congelação, o qual foi realizado em duas fases: a primeira a uma curva negativa de 15 ^{o}C/min e a segunda a 10 ^{o}C/min até atingir – 120 ^{o}C. Após o processo de congelação, as palhetas foram armazenadas em botijão criobiológico à temperatura de -196 °C até o momento da avaliação.

Para descongelação, duas palhetas de sêmen de cada reprodutor e de cada dia de colheita foram colocadas a 37 ºC, durante 30 segundos, para posterior análise de motilidade total e progressiva, vigor, assim como integridade do acrossoma e do DNA.

2.3.1 Extração das proteínas de membrana espermática

Após a descongelação do sêmen, as amostras das três colheitas do sêmen de cada garanhão foi acondiciona em um tubo de microcentrífuga e 60 µL desse *pool* foi colocado em tubos de microcentrífuga acrescidos, até 2,0 mL, de solução Tris-Cloreto (TC) (48 mg Tris – 4mM; 22 mg CaCl – 2mM água bidestilada q.s.p., pH 7,4) e centrifugado a 300xg por 10 minutos, em centrífuga refrigerada à temperatura de 4 ^{o}C. Esta etapa foi repetida quatro vezes para melhor lavagem dos espermatozóides descongelados e remoção do diluidor. Após a lavagem do sêmen, adicionou-se 1,0 mL do tampão de extração de proteínas de membrana plasmática, composto de solução TC – Triton X 100, a 0,2% (20 mL de Tampão TC e 40 µL de Triton X 100, a 0,2%). O precipitado assim tratado foi agitado em vortex por cinco minutos, e centrifugado a 9.300xg, durante 15 minutos. O sobrenadante obtido da centrifugação do precipitado constituiu o material utilizado para extração das proteínas do experimento. A este material foi adicionado 10% de Ácido tricloroacético (TCA), agitado em vórtex e centrifugado a 9.300xg, durante 15 minutos. O precipitado foi lavado com 500µL de acetona refrigerada, e centrifugado a 9.300xg, durante cinco minutos. Após este tratamento, procedeu-se a secagem à temperatura ambiente, obtendo-se, assim, o extrato de proteínas de membrana totais dos espermatozóides. O preparo das amostras para obtenção de proteínas ocorreu de acordo com o método de precipitação descrito por

Berkelman e Stensted (1998) e a concentração protéica determinada segundo Bradford (1976) (Comassie Brilhante Blue 250g, ácido ortofosfórico – MERK, USA).

2.3.2 Poliacrilamida gel de eletroforese em duas dimensões (2-D)

A focalização isoelétrica (FIO) foi realizada segundo Stenstedt et al. 2002 e o foco foi realizado em fitas "Immobiline Drystrips" de 7 cm com pH de 4-7. Antes da FIO, as fitas foram rehidratadas por 15 horas a 20 ^{0}C em uma solução tampão contendo Uréia 9M, CHAPS {3-[(3cholamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanesulfonato},2%, DTT 1%, IPG (pH 4-7) (Amersham Bioscience, Califórnia, USA), 2% e azul de bromofenol 0,002% (Cleveland, OH, USA), contendo 60 μg de extrato protéico de membrana plasmática. Para máxima reprodutibilidade as focalizações foram conduzidas de acordo com os seguintes parâmetros: 1 Vh, 2.800 Vh, 5.700 Vh, e 200 V, 3500 V por 3 h e 30 min (voltagem total aplicada ~ 8,5 kVh), utilizando o sistema de eletroforese MultiphorII(GEHealthcare).

A segunda dimensão, em gel de poliacrilamida a 15% (2DE SDS-PAGE), foi conduzida em corrente constante de 15mA por gel, utilizando sistema vertical (BIO-RAD). O padrão de peso molecular usado foi de 97 a 14 kDa (97 kDa – fosforilase; 66 kDa – albumina bovina; 45 kDa – ovalbumina; 36 kDa – gliceraldeído desidrogenase; 29 kDa – anidrase carbônica; 24 kDa – tripsinogênio; 20 kDa – inibidor de tripsina; 14 kDa - α-lactalbumina. Os géis foram banhados por 20 minutos em 120 mM de nitrato de prata (2g/L) contendo 0,75% (v/v) de formaldeído. O desenvolvimento foi interrompido com a adição de 100 mL de 10% de ácido acético por 10 minutos; por lavagens sucessivas em água (três vezes), por 20 minutos. Os géis corados permaneceram em água destilada para posterior análise.

2.3.3 Análise do gel

Cada gel foi escaneado com *Scanner* da HP e avaliado pelo programa de análise: com o *software* Phoretrix (Non Linear USA Inc., Durham, USA). Após a identificação dos pontos de proteína, a área (mm^2) e o volume (mm^2 x intensidade dos pixels) de cada um foi obtido pelo peso molecular (MW) e o ponto isoelétrico (p*I*), e normalizado pelo

experimento criado no *software* para analisar esses dados. O gel referente foi casualmente selecionado para o experimento e usado para comparar os pontos protéicos nos diferentes géis.

2.3.4 Análise das imagens

As análises dos géis 2-D foram realizadas através do programa Image Máster ™ (2-D Platinum software da Amersham Biociences).

2.4 Análise estatística

As características espermáticas (motilidades total e progressiva, vigor, integridade acrossomal e integridade de DNA) de cada reprodutor foram avaliadas antes e após a congelação. Diferenças entre as médias foram testadas através da análise de variância (ANOVA). A significância estatística foi estabelecida em nível de 0,05 de probabilidade.

3 Resultados

3.1 Avaliação seminal

Houve predominância do aspecto leitoso e da cor branca nos ejaculados. Todavia, foi observado aspecto aquoso em algumas amostras, especialmente naquelas colhidas na estação reprodutiva (verão). Com relação aos valores médios encontrados para o volume seminal dos reprodutores (Tabela 1), verificou-se que fora da estação reprodutiva (inverno) os valores foram de 56,89 ± 13,86 mL, enquanto que no verão estes valores apresentaram-se reduzidos (40,33 ± 9,80 mL). A concentração espermática encontrada em amostras de sêmen no verão demonstrou ser estatisticamente ($P<0,05$) inferior (148,33 ± 75,00 $x10^6$sptz/mL) ao observado no inverno (Tabela 1).

Durante as avaliações microscópicas do sêmen fora da estação reprodutiva e dentro dela, foram encontrados valores de motilidade total (MT) e progressiva (MP), respectivamente, 76,67 ± 5,59%; 66,67 ± 5,59 %; 83,89 ± 5,46%; 75,56 ± 6,35% para o

sêmen *in natura* (Tabela 1). Os valores de MT e MP dos espermatozóides no verão foram superiores (P<0,05) àqueles observados no inverno.

Da mesma forma, o vigor espermático do sêmen *in natura* apresentou-se estatisticamente superior (P<0,05) nas amostras colhidas na estação reprodutiva (4,00 ± 0,71), quando comparados àqueles colhidos na estação não reprodutiva (3,39 ± 0,42) (Tabela 1). No entanto, após a descongelação não houve variação significativa e os valores encontrados foram inferiores (2,33 ± 0,71 no verão e 2,22 ± 0,71 no inverno) àqueles evidenciados no sêmen *in natura*.

No sêmen descongelado, não se constatou diferença significativa entre as estações do ano, sendo os valores de MT (49,44 ± 22,84% e 45,56 ± 26,63%) e MP (41,67 ± 19,84%; 45,56 ± 26,63%), inverno e verão, respectivamente.

A análise de integridade do acrossoma (Tabela 1) evidenciou porcentual médio no sêmen descongelado (93,56 ± 6,64% no verão e 92,00 ± 5,48% no inverno) semelhante ao sêmen *in natura* (98,44 ± 1,51% e 96,78 ± 2,63%, respectivamente) nas estações de avaliação.

Nos estudos do DNA (Tabela 1) obteve-se 100,00% de células íntegras para os espermatozóides das amostras *in natura*, em ambas as estações, e valores semelhantes (99,33 ± 1,12% e 99,89 ± 0,33%) foram observados nos espermatozóides avaliados de amostras congeladas no verão e no inverno, respectivamente.

3.2 Eletroforese 2-D

Foram analisadas as proteínas de membrana espermática do *pool* das colheitas de sêmen de cada garanhão, onde puderam ser encontrados 33 pontos de proteínas do sêmen *in natura* no verão e 46 pontos de proteínas no inverno (Tabela 2). Dentre eles, 18 pontos de proteínas as seguintes características, foram comuns entre as estações: um (pI=5), dois (pI entre 5 e 6), um (pI entre 6 e 7), dois (pI =7) entre 24 e 29 kDa; um de 29 kDa (pI entre 4 e 5); um (pI entre 4 e 5) entre 29-36 kDa; dois (pI entre 4 e 5), um (pI =5), três (pI entre 5 e 6) e dois (pI entre 6 e 7) com 36 kDa; um (pI=6) entre 36 e 45 kDa e um entre 45-66 kDa (pI entre 6 e 7).

As proteínas com peso molecular entre 20 e 24 kDa estiveram presentes apenas no verão, enquanto que no inverno foram encontrados pontos de proteína entre 36 e 97 kDa

(Tabela 2). Foi observado também que os pontos de proteína das membranas plasmáticas dos três garanhões concentraram-se entre os pontos isoelétricos quatro e seis (Figuras 1, 2 e 3).

4 Discussão

Com relação aos valores médios encontrados para o volume seminal dos reprodutores, verificou-se que no inverno apresentaram-se dentro dos padrões normais, tomando-se como base os valores fornecidos por HAFEZ (1995) e pelo Manual para Exame Andrológico do CBRA (1998), enquanto que no verão estes valores apresentaram-se reduzidos, ficando inferiores ao mínimo de 50 mL citado nas referências acima. Este fato pode ser explicado pelo inadequado estímulo sexual dos reprodutores devido ao fato da égua utilizada como manequim não estar em cio, resultando em menor volume do ejaculado.

A concentração espermática encontrada em amostras de sêmen no verão demonstraram valor estatisticamente inferior ao observado no inverno e, predominantemente, abaixo de 150 milhões de espermatozóides/mL, mínimo determinado por HAFEZ (1995). Este fato explica o aspecto aquoso encontrado em amostras de sêmen colhidas no verão, e pode ter relação com o estímulo sexual inadequado por parte da fêmea utilizada como manequim, a qual não se encontrava em estro, fundamental para a maior excitação do garanhão (MIES FILHO, 1970), uma vez que segundo Jasko et al. (1990), menor concentração espermática foi observada fora do período reprodutivo (inverno).

Os valores de MT e MIP do sêmen *in natura* no verão foram superiores àqueles observados no inverno, concordando com Leme et al. (2003) ao relatarem superioridade de algumas características reprodutivas nos meses de primavera-verão, discordando de Janett et al. (2003) que, mensurando a motilidade espermática dos garanhões criados nas montanhas francesas, evidenciaram valores significativamente menores no verão em relação às outras estações. Esses autores relataram que as diferenças estacionais na motilidade espermática podem ser influenciadas pelas condições ambientais, como temperatura, umidade, etc. Todavia, no sêmen descongelado não foi constatada diferença significativa entre as estações de estudo. Magistrini e Palmer (1987),

avaliando a influência da sazonalidade e do ejaculado na produção de sêmen eqüino para congelação, observaram que o inverno foi caracterizado por maior motilidade espermática no sêmen congelado/descongelado, mesmo quando a motilidade do sêmen *in natura* foi pequena, concentração elevada e volume reduzido, sugerindo a influência da qualidade do plasma seminal na congelabilidade do sêmen. Além disso, a estação do ano não interferiu nos animais considerados "maus congeladores" em "bons congeladores". Talvez isso explique o fato de não ter havido diferença no sêmen descongelado, uma vez que em ambas as estações constatou-se boa qualidade espermática.

A análise de integridade do acrossoma apresentou porcentual médio semelhante no sêmen descongelado quando comparado ao sêmen *in natura* nas estações do ano. Este fato evidencia boa qualidade espermática para o sêmen colhido no verão ou inverno, demonstrando que amostras de sêmen podem ser obtidas nas duas estações quando se deseja criopreservar amostras de sêmen para posterior inseminação artificial, em virtude de integridade de acrossoma ser de fundamental importância ao processo de fertilização (GONZALEZ, 2004; ALVES, 2005), pois, geralmente é susceptível a dano durante o procedimento de criopreservação dos espermatozóides (MELO, 2003; ORTEGA, 2003) fato não observado neste experimento. Embora Blottner et al. (2001) tenham observado proporção maior de espermatozóides descongelados com reação acrossomica espontânea durante o inverno, sugerindo maior grau de reatividade da membrana espermática. Esses autores relatam também que os fatores que influenciam a qualidade espermática são criopreservação, garanhão e estação do ano, em ordem decrescente de importância.

Acredita-se que a maturação da cromatina espermática é completada no segmento distal do epidídimo, local de armazenamento espermático. Fora da estação reprodutiva (inverno), não têm sido relatadas diferenças na condensação da cromatina, com exceção da região da cauda do epidídimo (RODRIGUEZ e BUSTOS-OBREGÓN, 1994). Uma vez que os espermatozóides permanecem por um período de tempo muito longo nesse reservatório, a hipermaturação da cromatina tem sido descrita nos ejaculados obtidos fora do período de reprodução (verão) (PÉREZ-SAMPALLO, 1980). Porém, a integridade do DNA observada nos espermatozóides de amostras *in natura*, em ambas as estações, assim como em amostras descongeladas em ambas as estações, corrobora

com Blottner et al. (2001) e demonstra que os procedimentos de diluição e congelação das amostras de sêmen não danificaram de forma significativa o material genético destes gametas.

A observação de proteínas de membrana espermática, neste experimento encontradas no inverno com peso molecular entre 97 e 36kDa, mesmo período em que foi observado decréscimo significativo dos valores de MT e MIP e queda numérica dos valores de iAc pode estar de acordo com Brandon et al. (1999) correlacionando proteínas de plasma seminal com fertilidade, relataram que a SP-2 (75 kDa, pI=6,0) pode estar estruturalmente relacionada com a proteína de vesícula membranosa (70 kDa) encontrada por Davis (1978), a qual inibe a capacidade fertilizante do espermatozóide do garanhão através da estabilização da membrana plasmática. Esses autores relatam ainda a possibilidade da SP-2 ser uma subunidade do fator de infertilidade presente no plasma seminal de eqüino.

Anticorpos contra ubiquitina, proteína marcadora universal de proteínas a serem degradadas, demonstrou elevada reação cruzada com espermatozóides defeituosos em homens (SUTOVSKY et al., 2001a) e touros (SUTOVSKY et al., 2001b), também foi observado que o maior volume de superfície ubiquitinizada parece ocorrer no epidídimo (CHEN et al, 1998; BAARENDS et al., 1999). SUTOVSKY et al. (2003), testando possíveis implicações na ubiquitinação das proteínas espermáticas de garanhões, verificaram que existe controle da qualidade espermática no epidídimo desta espécie e que estudos preliminares sugerem que esse sistema pode estar envolvido no decréscimo espermático de garanhões sob influência sazonal. Esses autores relatam que progressivo aumento das concentrações de espermatozóides marcados pela ubiquitina foram observados durante o verão no hemisfério norte. Talvez isso explique o fato de ter sido encontrado maior número de pontos protéicos no inverno do que no verão, uma vez que o calor pode ter comprometido a termorregulação testicular já que os animais permaneceram estabulados durante todo o experimento, provocando a destruição de algumas proteínas no epidídimo, sem comprometer a qualidade espermática.

Com exceção do vigor espermático, os resultados obtidos com as análises espermáticas, nas estações reprodutivas (verão) e fora desta (inverno), demonstraram manutenção da qualidade seminal após o processo de criopreservação. É possível

também que as proteínas com peso molecular entre 97 e 36 kDa podem indicar baixa qualidade espermática.

5 Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro e à Médica Veterinária Ana Emília Motta (Aparthorse) pela concessão dos garanhões utilizados nesse estudo.

6 Referências

ALVES, S. G. G.; RIBEIRO FILHO, A. L.; SNOECK, P. P. N. et. al. Efeito da solução, da fixação em formol-salina e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para sêmen eqüino congelado. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 219-225, 2005.

BAARENDS, W.M.; HOOGERBRUGGE, J.W.; ROEST, H.P. et al. Histone ubiquitination and chromatin remodelling in mouse spermatogenesis. **Dev. Biol.**, v. 207, p. 322-333, 1999.

BATOVA, I.N.; IVANOVA, M.D.; MALLOVA, S. et al. Human sperm surface glycoprotein involved in sperm-zona pellucida interaction. **J. Androl.**, v. 21, p. 141-153, 1998.

BERKELMA, T.; STENSTED, T. **2-D eletrophoresis: using immobolized pH gradients, principles & methods**. Piscataway: Amersham Pharmacia Biotech, 1998. 50p.

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A et al. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 65, p. 75-88, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B. et al. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52, p. 863-873, 1999.

CHEN, H.Y.; SUN, J.M.; ZHANG et al. Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testis. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 13165-13269, 1998.

CLAY, C.M.; CLAY, J.N. Endocrine and testicular changes associated with season, artificial photoperiod and the peri-pubertal period in stallion. In: BLANCHARD, TL, VARNER, DD (Eds) Stallion managment. **Vet. Clin. North Amer.,** v. 8, p. 31-56, 1992.

DAVIS, B.K. Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. **Am. Oil Chem. Soc. Monograph**, v. 5, p. 145-158, 1978.

EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **J. Androl.**, v. 23, n. 1, p. 25-43, 2002.

GORMAN, M.R.; ZUCKER, I. Seasonal adaptation of siberian hamster: II. Paterno of change in day lenght controls annual testicular and body weight rhythms. **Biol. Reprod.**, v. 53, p. 116-125, 1995.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana do espermatozóide bovino.** Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade de São Paulo, 2004.

HAFEZ E. S. E. **Reprodução Animal.** 6ª ed, São Paulo: Editora Manole LTDA, 582 p., 1995.

JANETT, F.; THUN, R.; BETTSCHEN, S. et al. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches Montagnes stallions. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 77, p. 213-221, 2003.

JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided analysis in the stallion. **Theriogenology**, v. 35, n. 2, p. 317-327, 1990.

KENNEY, R.M.; BERMAN, R.V.; COOPER, W.L. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTIONERS, 21, 1975, Boston. **Proceedings…**, Boston, 1975. p. 327-336.

LEME, D.P.; PAPA, F.O.; ROSER, J.F. et al. Sazonalidade reprodutiva de garanhões nos trópicos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**., v. 27, n. 2, p. 207-209, 2003.

MAGISTRINI, M.; PALMER, C. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. **J. Reprod. Fertil., Suppl.**, v. 35, p. 127-133, 1987.

Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), Minas Gerais**,** 2ª ed., 49 p., 1998.

MELO, C. M. **Ação dos crioprotetores na biotecnologia de sêmen congelado**. Seminário (Disciplina de Seminários I do curso de Mestrado) Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2003.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4ª ed., Porto Alegre:Livraria Sulina Editora, v. 2, 765 p., 1970.

O`RAND, M.G.; WIDGREN E.E.; FISHER, S.J. (1979) Changes of sperm surface properties correlated with capacitation. In FAWCETT D.W. and BEDFORD J.M. (eds), The spermatozoon. Urban and Schwarzenberg, Baltimore, USA.

ORTEGA, A. M.; IZQUIERDO, A. C.; GÓMEZ, J. J. H. et al. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. **Interciencia,** v. 28, n. 12, p. 699-704, 2003.

PÉREZ-SAMPALLO, J. **Nuevas técnicas en el estudio de semen de potro, citoquímica cuantitativa de proteínas y microscopia eletrônica de barrido**. Xx p. Tesis (Magíster en Ciencias Veterinarias) Univerdad de Chile, 1980..

ROBINSON, J.E.; KARSCH, J.E. Photoperiodic history and a changing melatonin pattern can determine the neuroendocrine response of the ewe to daylenght. **J. Reprod. Fértil.**, v. 80, p. 159-165, 1987.

RODRÍGUEZ, H.; BUSTON-OBREGÓN, E. Seasonal and epididymal maturation of stallion spermatozoa. **Andrologia**, v. 26, p. 161-164, 1994.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C.; ESPER, C.R. et al. Fertility-associated proteins in nelore bull sperm membranes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 91, p. 77-87, 2006.

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

STENSTEDT, T.B.; BJELLQVIST, B.; LAIRD, N. et al. **2-D Electrophoresis-Principles and methods (Manual),** 2002.

SUTOVSKY, P.; TERADA, T.; SCHATTEN, G. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. **Hum. Reprod**., v. 16, p. 250-258, 2001a.

SUTOVSKY, P.; MORENO, R.; RAMALHO-SANTOS, J. et al. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. **J. Cell. Sci.**, v. 114, p. 1665-1675, 2001b.

SUTOVSKY, P.; TURNER, R.M.; HAMEED, S. et al. Differential ubiquitination of stallion sperm proteins: possible implications for fertility and reproductive seasonality. **Biol. Reprod**., v. 68, p. 688-698, 2003.

WASSARMAN, P.M. Profile of a mammalian sperm receptor. **Development**, v. 108, p. 1-17, 1990.

Tabela 1 - Parâmetros espermáticos de amostras seminais de reprodutores eqüinos da raça Mangalarga Marchador, colhidas nas estações reprodutivas (verão) e não reprodutivas (inverno), antes e após congelação

	Estação Reprodutiva		**Estação Não Reprodutiva**	
Parâmetros	**Sêmen *in natura***	**Pós-congelação**	**Sêmen *in natura***	**Pós-congelação**
Volume (mL)	40,33 ± 9,80[b]	---------	56,89 ± 13,86[a]	---------
Concentração (10^6sptz/mL)	148,33 ± 75,00[b]	---------	533,33 ± 256,03[a]	---------
MT (%)	83,89 ± 5,46[a]	45,56 ± 26,63	76,67 ± 5,59[b]	49,44 ± 22,84
MIP (%)	75,56 ± 6,35[a]	45,56 ± 26,63	66,67 ± 5,59[b]	41,67 ± 19,84
Vigor (1-5)	4,00 ± 0,71[a]	2,33 ± 0,71	3,39 ± 0,42[b]	2,22 ± 0,71
Int.acros. (%)	98,44 ± 1,51	93,56 ± 6,64	96,78 ± 2,63	92,00 ± 5,48
Int.DNA (%)	100,00 ± 0,00	99,33 ± 1,12	100,00 ± 0,00	99,89 ± 0,33

Letras diferentes na mesma linha indicam $P < 0,05$.

Tabela 2-Proteínas da membrana plasmática de amostras de sêmen *in natura* de reprodutores da raça Mangalarga Marchador, colhidas nas estações reprodutivas – verão e não reprodutivas – inverno.

Sêmen *in natura*				
Peso Molecular	**Verão (33 pontos proteicos)**	**Inverno (46 pontos proteicos)**	**Verão x Inverno**	**pI***
20-24 kDa	1	-----	-----	4
	2			4-5
	1			6-7
	1			7
24 a 29 kDa	1	-----	------	4
	3	-----	------	4-5
	1	2	1	5
	2	2	2	5-6
	1	1	1	6-7
	2	2	2	7
29 kDa	2	1	1	4-5
	------	1	------	5-6
	1	------	------	6-7
	1	------	------	7
29 a 36 kDa	3	1	1	4-5
	-----	1	------	5
36 kDa	2	2	2	4-5
	2	1	1	5
	3	4	3	5-6
	-----	3	-----	6
	2	2	2	6-7
36 a 45 kDa	------	1	------	4-5
	------	3	------	5
	------	2	------	5-6
	1	3	1	6
	------	1	------	6-7
45 a 66 kDa	-----	2	------	4-5
	------	-----	------	5-6
	------	2	------	6
	1	1	1	6-7
	------	1	------	7
66 kDa	------	3	-------	4-5
66 a 97 kDa		1		4-5
	-------	2	-------	5-6
		1		6-7

*pI= ponto isoelétrico

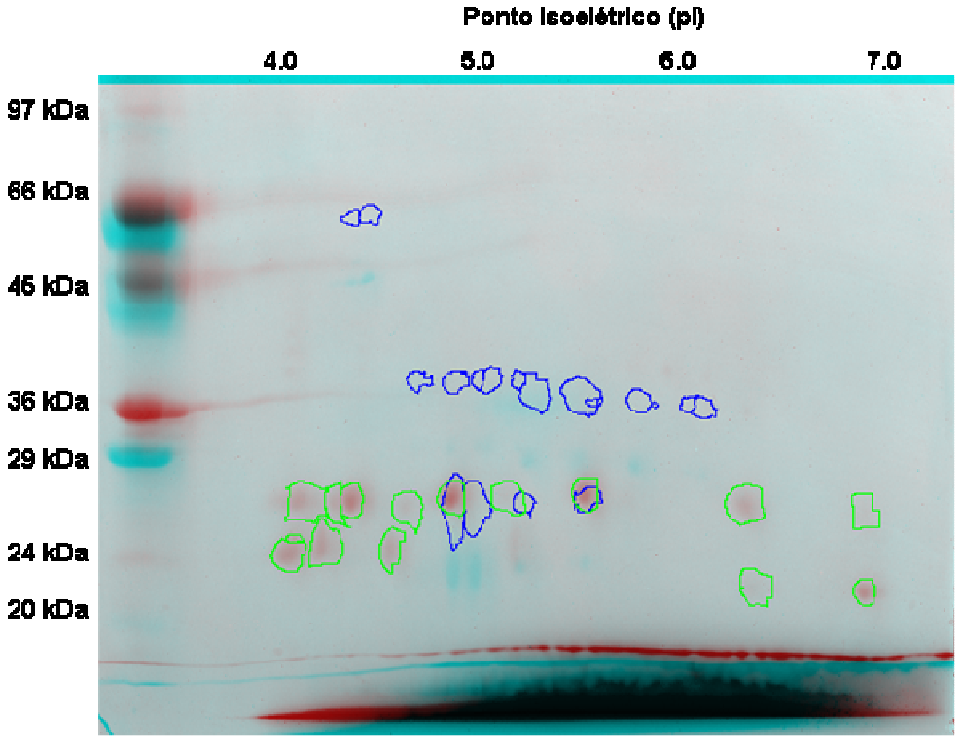

Figura 2 - Gel de eletroforese bidimensional de proteínas de membrana plasmática de espermatozóides retiradas do *pool* de amostras do animal 1 da raça Mangalarga Marchador obtidas na estação reprodutiva (verde) e não reprodutiva (azul).

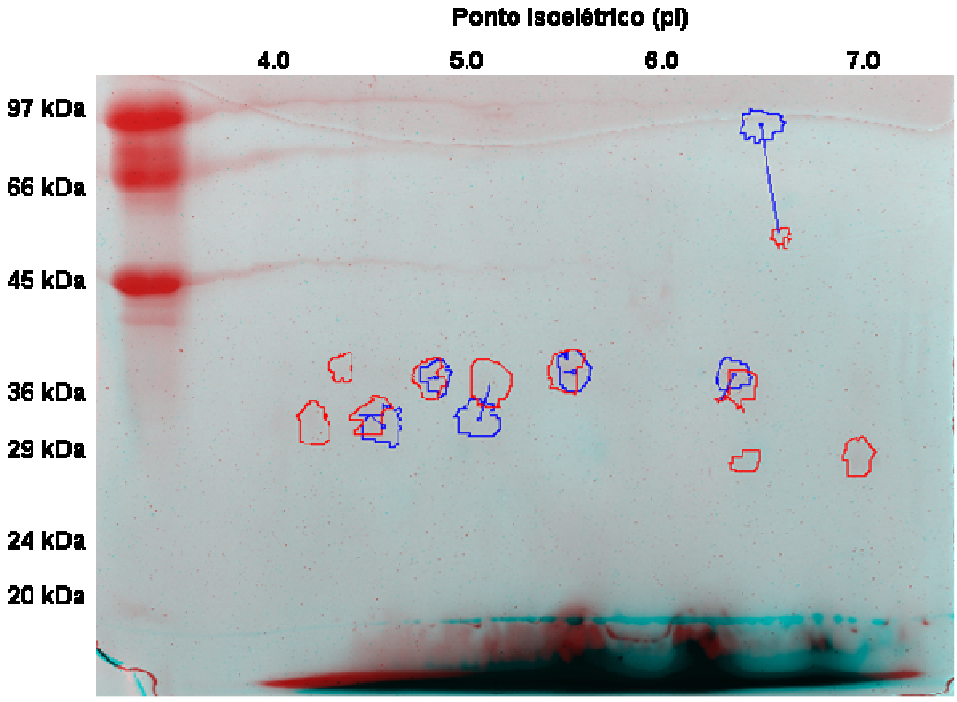

Figura 3 - Gel de eletroforese bidimensional de proteínas de membrana plasmática de espermatozóides retiradas do pool de amostras do animal 2 da raça Mangalarga Marchador obtidas na estação reprodutiva (vermelho) e não reprodutiva (azul).

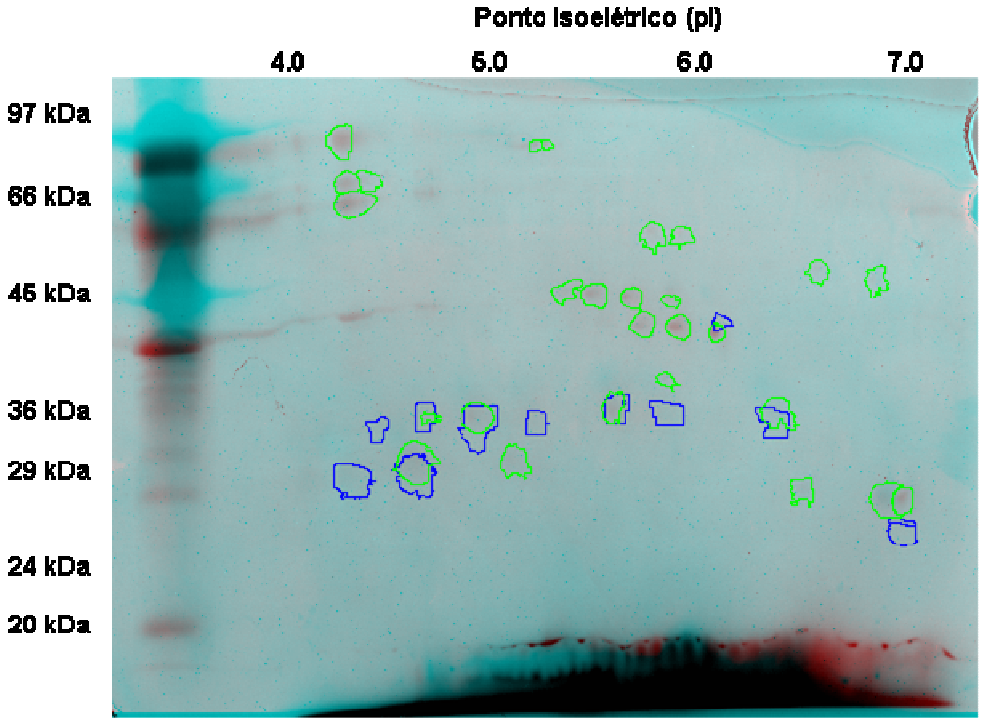

Figura 4 - Gel de eletroforese bidimensional de proteínas de membrana plasmática de espermatozóides retiradas do pool de amostras do animal 3 da raça Mangalarga Marchador obtidas na estação reprodutiva (azul) e não reprodutiva (verde).

3.2 Adição de piruvato e trolox ao diluidor utilizado para congelação de sêmen de reprodutores eqüinos colhido no período reprodutivo em região de clima mediterrâneo

(Effect of Pyruvate and Trolox added to the extender used for freezing of stallion semen collected during the reproductive station in region of Mediterranean climate)

K.M.G. Silva[a3], M.M.P. Guerra[a], S.C. Gamboa[b], A.S. Rodrigues[c], J. Ramalho-Santos[c]

[a]*Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;*

[b]*Laboratório de Reprodução Animal, Departamento de Ciências Zootécnicas, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra, Bencanta, 3040-316 Coimbra, Portugal;*

[c]*Departamento de Zoologia, Centro de Neurociência e Biologia Celular de Coimbra, Universidade de Coimbra, 3004-517 Coimbra, Portugal*

Resumo

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da adição de piruvato e trolox ao diluidor utilizado para congelação do sêmen de reprodutores eqüinos férteis e sub-férteis colhido durante a primavera-verão em região de clima mediterrâneo. Para congelação, foi adicionado ao diluente INRA82-HEPES (20mM HEPES, 2,0% de gema de ovo e 5% de glicerol) antioxidantes com o intuito de proteger o sêmen de garanhões férteis e sub-férteis dos efeitos deletérios da criopreservação, seguindo os seguintes tratamentos: T1 (Controle)= INRA82-HEPES sem antioxidantes; T2= INRA82-HEPES + 120 mM de trolox e T3= INRA82-HEPES + 2mM de piruvato. As amostras de sêmen descongeladas foram avaliadas quanto a motilidade total e progressiva, integridades de membrana, do acrossoma e do DNA, estabilidade membranar e potencial de membrana mitocondrial. Observou-se que o sêmen dos animais férteis apresentou superioridade nas motilidades total e progressiva em relação aos animais sub-férteis, independente da adição de antioxidante. Ao se comparar os parâmetros espermáticos dos garanhões de acordo com a fertilidade e a adição de substâncias antioxidantes, constatou-se que a adição de piruvato proporcionou resultados significativamente superiores ($P<0,05$) àqueles obtidos com trolox na motilidade espermática total. Por conseguinte, conclui-se que a adição de piruvato melhora a motilidade espermática em garanhões férteis e sub-férteis submetidos à congelação na primavera/verão na região de clima mediterrâneo e que a associação dos dois antioxidantes pode potencializar a ação contra espécies de oxigênio reativo.

[3] Autor para correspondência. Tel.: 55-81-34679886; E-mail: karenmascaro1@hotmail.com (K.M.G. Silva)

Palavras Chave: Antioxidantes, congelação, viabilidade espermática, eqüino.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the effect of pyruvate and trolox added to the extender used for freezing of fertile and sub-fertile stallion semen collected during the reproductive station in region of Mediterranean climate. For freezing, antioxidants were added to INRA 82-HEPES diluent (20 mM HEPES, 2.0% of egg yolk and 5 % of glycerol) to protect of the deleterious effect of fertile and sub-fertile stallion semen, according to the treatments: T1= INRA82-HEPES without antioxidants; T2= INRA82-HEPES + 120 mM de trolox and T3= INRA82-HEPES + 2mM of pyruvate. The thawed semen samples were evaluated according to the total and gradual motility, vitality, acrosomal and DNA integrity, membrane stability and mitochondrial membrane potential. It was observed that the fertile animals have superiority in the total and progressive motility in relation to the sub-fertile animals, independent of the addition of antioxidant substances. When comparing the spermatic parameters of the stallions according to fertility and antioxidant substance, it was observed that the addition of pyruvate provided resulted significant higher ($P<0.05$) to that obtained with trolox at total sperm motility. So, it can be concluded that the addition of pyruvate improve sperm motility on the fertile and sub-fertility stallion submitted to freezing on the beginning of reproductive station at Mediterranean climate and the association of two antioxidant may be potencialized the protection against reactive oxigen species.

Keywords: Antioxidant, freezing, spermatic viability, equine.

1 Introdução

O garanhão é um reprodutor de dias longos, apresentando ciclo reprodutivo anual (CLAY e CLAY, 1992) nas regiões temperadas onde as estações do ano são bem definidas e com clima previsível, apresentando algumas características reprodutivas inferiores ao padrão normal durante os meses de inverno (LEME et al., 2003). Todavia, o inverno é o melhor período para conservação do sêmen eqüino (MAGISTRINI et al., 1987), apesar de maior número de células apresentarem reação acrossômica espontânea, sugerindo maior grau de susceptibilidade a danos de membrana (BLOTTNER et al., 2001). Além de diferenças na criopreservação do sêmen de garanhões relacionadas à estação reprodutiva, a viabilidade das células pós-descongelação pode variar com o garanhão (PADILLA e FOOTE, 1991), com o ejaculado (AMAN et al., 1987) e com a temperatura de armazenamento (SAMPER et al., 1991; JASKO et al., 1992).

Os espermatozóides possuem a capacidade inerente de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) responsáveis por alterações espermáticas indispensáveis ao processo de fertilização. Entretanto, a produção excessiva desses oxidantes determina estresse

oxidativo que prejudica a sobrevivência e a manutenção da capacidade fertilizante desses gametas (GUERRA et al., 2004). Muitos procedimentos utilizados em laboratório, como centrifugação (TWIGG et al., 1998) e congelação (CEROLINI et al., 2001; CHATTERJEE e GAGNON, 2001) aumentam a produção de ROS, assim como remoção do plasma seminal, considerado fonte de proteção anti-oxidante dos espermatozóides (CEROLINI et al., 2001). Em mamíferos, as membranas espermáticas são ricas em ácidos graxos polinsaturados, tornando-as susceptíveis a danos peroxidativos induzidos por radicais livres (De LAMIRANDE e GAGNON, 1995; SIKKA, 2004), determinando perda de suas funções (AGARWAL e SAID, 2003; CHRISTOVA et al., 2004) e da integridade do DNA (AGARWAL e SAID, 2003; BAUMBER et al., 2003; CHEN et al., 2003), além de depleção de ATP responsável pela fosforilação axonemal insuficiente e perda de motilidade espermática (De LAMIRANDE et al., 1997).

Visando reduzir danos oxidativos causados pela elevada concentração de ROS, alguns pesquisadores têm adicionado substâncias antioxidantes em amostras de sêmen de várias espécies, inclusive eqüinos (MARQUES et al., 2002; ALMEIDA e BALL, 2005). O piruvato sódico, ânion do ácido pirúvico, tem sido conhecido como captador de peróxido de hidrogênio nos sistemas celulares, promovendo proteção contra danos oxidativos (O´DONNELL-TORMEY et al., 1987; VARMA et al., 1990; SALAHUDEEN et al., 1991), através de sua ligação ao O_2^- liberado da degradação peroxídica, considerado ainda como excelente substrato energético podendo se mover livremente no citoplasma e nas mitocôndrias da célula (UPRETI et al., 1997). A vitamina E (α-tocoferol e seus derivados) protege as células de radicais de oxigênio, *in vivo* e *in vitro*, e acredita-se ser o inibidor primário de radicais livres encontrados em pequenas quantidades nas membranas celulares e no plasma seminal de mamíferos (SIKKA, 2004). Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da adição de piruvato e trolox ao diluidor utilizado para congelação do sêmen de reprodutores equinos férteis e sub-férteis colhido no período de primavera-verão no hemisfério norte.

2 Material e Métodos

2.1 Material

FITC conjugado ao PSA *(Pisum sativum* lecitina*)*, trolox e solução salina de tyrode foram obtidos da Sigma (Saint Louis, MO, USA), enquanto piruvato, iodeto de Ppropídio associado ao SYBR-14, merocianina 540, fluorocromo catiônico 5,5´,6,6´-tetracloro-1,1´,3,3´-tetraetilbenzimidazoli-iodedo carbocianine (JC-1) e laranja de acridina foram obtidos da Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA).

2.2 Colheita de sêmen e avaliação da qualidade espermática

O estudo foi realizado durante a estação reprodutiva (primavera-verão) no hemisfério norte, região de clima mediterrâneo, e amostras de sêmen foram obtidas de cinco garanhões de raças distintas que permaneceram estabulados na Escola Superior Agrária de Coimbra (Coimbra, Portugal). Estes garanhões foram submetidos, no início da época reprodutiva, a exame andrológico para avaliação da produção espermática e utilizados em um programa de inseminação artificial. Foram classificados com férteis (Puro Sangue Lusitano, Anglo-Árabe, Holstein) e sub-férteis (Sorraia e Garrana) de acordo com o exame andrológico e as taxas de prenhez (60,60% e 30,00% respectivamente) obtidas com sêmen fresco na época de reprodução do decorrente período.

Amostras de sêmen foram colhidas a cada três dias, totalizando cinco ejaculados de cada reprodutor, utilizando vagina artificial (modelo INRA) com auxílio de um manequim (Modelo Hannover) e na presença de uma égua em cio.

Após colheita, as amostras de sêmen foram filtradas com gaze para remoção do gel e partículas grandes de impurezas. As amostras sem gel foram mantidas a 35 ^{o}C em banho-maria durante diluição e análise da qualidade espermática: (a) motilidade total e motilidade progressiva foram avaliadas de forma subjetiva sob microscópio óptico com platina aquecida a 35 ºC, (b) concentração espermática foi calculada usando um fotocolorímetro a 546 nm previamente calibrado tendo por método de referência contagens em hemocitômetro (Colorimeter 254, Ciba-corning).

2.2.1 Integridade de membrana

A porcentagem de células foi avaliada utilizando iodeto de propidio (IP) associado ao SYBR-14 (GARNER e JOHNSON, 1995). O SYBR-14 foi preparado em Dimetilsulfóxido (DMSO), a uma concentração de 1 mg/mL. A solução de trabalho do SYBR-14 diluído a 1:10 com DMSO foi usado para corar os espermatozóides testados. O IP foi dissolvido na solução salina de Tyrode a 2 mg/mL. Amostras de sêmen *in natura* e descongeladas foram diluídas a concentração final de 20 x 10^6 espermatozóides/mL em meio Hank's HEPPES[4] (HH) e BSA (HH mais 1% de BSA) a 35 ^oC com 0,27 μL da solução de trabalho do SYBR-14 e 2 μL da solução de trabalho do IP. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 35 ^oC com SYBR-14 e depois adicionou-se IP, incubando por mais 5 minutos antes da avaliação. Quando excitado a 488 nm, o SYBR-14 penetrou nas membranas íntegras fluorescendo-as de verde brilhante, enquanto o núcleo dos espermatozóides com membranas lesadas exibiu fluorescência vermelha (IP). Os espermatozóides foram monitorados em microscópio de fluorescência HUND H 600 AFL usando um filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm, filtro de supressão a 520 nm).

2.2.2 Estabilidade das membranas

A solução estoque foi preparada em DMSO e estocada a 4ºC. O sêmen foi diluído em 0,5 mL de meio à base de leite desnatado UHT na concentração final de 25x10^6 espermatozóides/mL e incubado por 30 minutos em banho-maria a 35 ºC com Merocyanina-540 (2,7μM). Após este período, procedeu-se à análise das amostras em microscópio de fluorescência, anteriormente citado, com comprimento de onda entre 510-520 nm. Para cada ejaculado, 200 espermatozóides foram contados e duas sub-populações foram encontradas: espermatozóides com membranas instáveis apresentando fluorescência (merocianina-positiva) e espermatozóides com membrana estável não apresentando fluorescência (merocianina-negativa).

[4] SIGMA,USA.

2.2.3 Potencial de membrana mitocondrial

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada utilizando-se fluorocromo catiônico 5,5´,6,6´-tetracloro-1,1´,3,3´-tetraetilbenzimidazol-iodedo carbonine (JC-1), associado ao IP/SYBR-14 (HUO et al., 2002). Alíquotas de 2,04 μM de JC-1 diluídas em 100 μL de solução de HH/BSA foram adicionadas às amostras de sêmen *in natura* ou descongeladas, previamente coradas com SYBR-14 e IP. Essas amostras permaneceram incubadas a 35 ^{o}C durante 30 minutos e, a seguir, observadas em microscópio de fluorescência. Por microscopia foi possível distinguir duas sub-populações de espermatozóides viáveis (SYBR14 positivo – núcleo com fluorescência verde) quanto ao potencial mitocondrial: espermatozóides com elevado potencial apresentando mitocôndrias com fluorescência vermelho-laranja e espermatozóides com baixo potencial apresentando mitocôndrias com fluorescência verde.

2.2.4 Integridade do acrossoma

Foi avaliada pelo conteúdo do marcado FITC-PSA (*Pisum sativum* aglutinina ligado ao isotiocianato fluorescinado) (CASEY et al., 1993). Uma solução estoque de FITC-PSA foi preparada pela diluição de 2mg de FITC-PSA em 2 mL de HH e foi armazenada em alíquotas a – 20 ^{o}C. Amostras de sêmen foram diluídas na concentração final de 20 x 10^6 espermatozóides/mL em meio HH/BSA a 35 ^{o}C, fixada durante 10 minutos em 2% de paraformaldeído e lavada através de centrifugação a 600 x *g* durante 30 minutos a 20 ^{o}C. As amostras formam permeabilizadas usando etanol a 95% em HHBSA (1%) durante 30 minutos a 4 ^{o}C e então lavadas com HH. As amostras foram então incubadas em FITC-PSA na concentração final de 1mg/mL durante 15 minutos a 4 ^{o}C. Amostras de células espermáticas (μL) foram colocadas em lâminas de microscopia cobertas com lamínulas e 200 células/ejaculado foram visualizadas em microscópio de fluorescência. Dois tipos celulares foram identificados: acrossoma com fluorescência completamente verde (acrossoma intacto) ou apenas uma faixa fluorescente no segmento equatorial da cabeça espermática (acrossoma reagido).

2.2.5 Integridade do DNA

Dez microlitros da amostra de sêmen *in natura* ou descongelada foram armazenadas em 990 μL de uma solução [0,877g de NaCl (0,15M); 0,1576g de TRIS.HCl (0,01M); 37,2 mg de EDTA.Na_2.$2H_2O$ (1mM); q.s.p. 100mL em pH de 7,4] a -196 ^oC para posterior avaliação da integridade de DNA espermático usando o corante laranja de acridina (SAILER et al., 1995). Alíquotas (100 μL) das amostras foram descongeladas a 37 ^oC e transferidas para tubos de microcentrífuga colocados em gelo, onde foram adicionados 200 μL da solução ácido detergente [0,1 mL Triton X-100 (0,1% v/v); 0,877g de NaCl (0,15M); 8 mL 1N HCl (0,08N)], e incubou-se durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 600 μL da solução de laranja de acridine – solução C [60 μL da solução B (1mg de laranja de acridina em 1 mL de água de miliQ) adicionado em 9940 μL da solução A (37 mL de ácido cítrico 0,1M; 63 mL de fosfato de sódio a 0,2 M; 0,877 g NaCl (0,15 M) e 37,2 mg EDTA (1mM) em pH 6,0]. Após homogeneização, 200 células foram avaliadas em microscópio de fluorescência. As células coradas de verde fluorescente foram classificadas como portadoras de DNA íntegros, enquanto aquelas que emitiram fluorescência vermelha, laranja ou amarelado foram classificadas como portadoras de DNA desnaturado.

2.3 *Congelação, descongelação e análise de sêmen*

Amostras de sêmen foram congeladas segundo a técnica de Palmer (1984) modificada por Vidament et al. (2001). Após a colheita e análise do sêmen, procedeu-se à diluição em meio INRA82 (25g de glucose anidra; 1,5g de lactose $1H_2O$; 1,5g de rafinose $5H_2O$; 0,25g de citrato de sódio $2H_2O$; 0,41g de citrato de potássio $1H_2O$; 4,76g de HEPES e água deionizada q.s.p. 0,5L; 0,5L de leite desnatado UHT; 50mg de sulfato de gentamicina; 50.000 UI de penicilina; pH 6,8 e 310 mOsm/kg), na concentração final de $20x10^6$ espermatozóides (para ejaculados com baixa concentração espermática) ou $50x10^6$ espermatozóides (para ejaculados com elevada concentração espermática). Após 10 minutos de incubação a 22 ^oC, as amostras de sêmen foram centrifugadas a 600xg por 10 minutos. A seguir, os *pellets* foram ressuspensos ($100x10^6$ espermatozóides/mL) em meio INRA82 com 5% de glicerol, e divididos em três

alíquotas de acordo com os tratamentos: T1= INRA82 sem antioxidantes (Controle); T2= INRA82 com 120 mM de trolox – tendo como referência resultados prévios obtidos com sêmen resfriado e T3= INRA82 com 2mM de piruvato, segundo Bruemmer et al. (2001) utilizando sêmen resfriado. Após 80 minutos sob refrigeração a 4 ^{o}C, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL contendo $50x10^{6}$ células e colocadas em vapor de nitrogênio líquido a uma distância de 4 cm durante 10 minutos. A seguir, as palhetas foram congeladas e armazenadas em Nitrogênio Líquido a -196 ^{o}C. Foi testada, previamente, a influência dos antioxidantes e das concentrações utilizadas no sêmen, na motilidade espermática, através do Teste de Termo-Resistência.

Após descongelação (35 ^{o}C, 30 segundos), duas palhetas de cada reprodutor/dia foram colocadas em banho-maria (35 ^{o}C) e submetidas às avaliações de motilidade total, motilidade progressiva, vitalidade espermática, estabilidade das membranas, potencial de membrana mitocondrial, integridade acrossomal e integridade de DNA

2.4 *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada no programa SPSS versão 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os dados foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias e avaliou-se a influência do tratamento antioxidante na qualidade do sêmen após descongelação independente do indivíduo ou da fertilidade (ANOVA). Por meio do teste T avaliaram-se as diferenças entre grupos de fertilidade para cada um dos parâmetros espermáticos estimados após descongelação e para cada tratamento.

3 Resultados

3.1 Motilidade total e progressiva

A motilidade espermática total e progressiva das amostras de sêmen colhidas de reprodutores férteis (63,22% e 49,67%, respectivamente) foi estatisticamente superior ($P<0,05$) àquelas obtidas dos reprodutores sub-férteis (33,00% e 18,5%, respectivamente). Todavia, após a descongelação, estes parâmetros reduziram significativamente ($P<0,05$) nos ejaculados de todos os garanhões, sem evidenciarem

diferença estatística significativa entre as amostras dos reprodutores férteis (13,37% e 8,31%, respectivamente) e sub-férteis (16,71% e 11,83%). Ao se avaliar a motilidade total, considerando os grupos de fertilidade e os tratamentos utilizados, pós-descongelação (Fig. 1a), observou-se que os porcentuais das amostras colhidas tanto de reprodutores férteis quanto sub-férteis foram superiores (P<0,05) quando criopreservadas com INRA 82 acrescido de piruvato (18,92% e 19,00%, respectivamente) àqueles do grupo Controle (12,08% e 16,63%, respectivamente) ou suplementado com trolox (9,17% e 14,50%, respectivamente). Todavia, a motilidade progressiva observada nos diferentes tratamentos para o grupo dos animais férteis (T1=7,75%, T2=4,67% e T3=12,5%) não diferiu significativamente do observado para o grupo dos sub-férteis (T1=11,60%, T2=10,20% e T3=13,70%) (Fig. 2b).

3.2 Integridade de membrana

Através da análise da integridade da membrana espermática do sêmen imediatamente após a colheita, foram observdos porcentuais de 72,15% e 55,00% para os garanhões férteis e sub-férteis, respectivamente, evidenciando diferença estatisticamente significativa (P<0,05) entre os grupos de animais. Dentro de cada grupo de fertilidade não se observaram diferenças pós-descongelação entre os tratamentos utilizados para os férteis (T1= 27,65%, T2= 32,00% e T3=28,50%) e sub-férteis (T1=21,23%, T2=32,00% e T3=20,00%) (Figs. 2, 8A1 e 8A2).

3.3 Estabilidade de membrana

No sêmen *in natura* os valores encontrados foram 82,33% e 60,62% para férteis e sub-férteis respectivamente. Após descongelação, as amostras do grupo Controle evidenciaram médias de 57,35% e 57,32% de estabilidade de membrana para os animais férteis e sub-férteis, respectivamente. Todavia, ao se adicionar trolox nas amostras colhidas de garanhões férteis constatou-se que houve pequeno aumento não significativo (59,92%), enquanto nas amostras dos animais sub-férteis observou-se aumento pouco maior (61,30%) em relação ao Controle. Da mesma forma, ao se adicionar piruvato ao meio de congelação de amostras de sêmen de animais férteis

constatou-se discreto aumento no porcentual de células com estabilidade de membrana (58,42%) em relação ao Controle, enquanto nas amostras colhidas de reprodutores sub-férteis o aumento foi numericamente elevado, mas não significativo (63,10%) em relação ao trolox (Fig. 2).

3.4 Potencial mitocondrial

O porcentual de células com elevado potencial mitocondrial em amostras de sêmen *in natura* foi de 66,67% e 46,50% nos ejaculados dos garanhões férteis e sub-férteis, respectivamente, evidenciando diferença estatística significativa (P<0,05). No entanto, estes valores reduziram significativamente (P<0,05) após a congelação, onde se observou 25,17% e 19,49%, respectivamente para os garanhões férteis e sub-férteis, evidenciando diferença estatisticamente significativa (P<0,05) em relação ao sêmen *in natura*. Todavia, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos Controle (24,55% e 16,88%, respectivamente) ou suplementados com trolox (24,00% e 20,00%, respectivamente) ou piruvato (26,95% e 21,60%, respectivamente) para os animais férteis e sub-férteis (Figs. 3, 8C1 e C2).

3.5 Integridade do acrossoma

Ao classificar os espermatozóides de acordo com a integridade do acrossoma, observou-se no sêmen *in natura* valores de 82,61% e 77,88%, para os garanhões férteis e sub-férteis, respectivamente, sem evidenciar diferença estatística significativa entre eles. Após a descongelação, constatou-se diferença estatística significativa (P<0,05) entre os animais de acordo com a sua fertilidade, onde se observou maiores valores para os animais férteis (87,08%) quando comparados aos sub-férteis (75,37%). Todavia, não houve diferença estatística nos tratamentos entre os férteis (T1=88,78%, T2=88,33 e T3=84,13%) e sub-férteis (T1=74,38%, T2=75,50% e T3=76,23%) (Figs. 3b e 8B1).

3.6 Integridade de DNA

A análise da integridade do DNA detectou 89,22% e 81,17% de células com DNA íntegros em amostras de sêmen *in natura* de animais férteis e sub-férteis, respectivamente, sem demonstrar diferença estatística significativa entre elas. Após a descongelação, observou-se diferença estatística significativa (P<0,05) ao se comparar o porcentual de células com DNA íntegros de acordo com a fertilidade dos reprodutores, com superioridade dos animais férteis (80,34%) em relação aos sub-férteis (68,12%). Entretanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos para os grupos férteis (T1=82,83%, T2=78,58% e T3=79,62%) e sub-férteis (T1=62,05%, T2=72,10% e T3=70,20%) (Figs. 4 e 5).

4 Discussão

Vários parâmetros seminais (motilidade total e progressiva, integridade de membrana, estabilidade de membrana, potencial de membrana mitocondrial e integridade acrossomal) evidenciaram diferença estatística significativa entre amostras de sêmen colhidas de garanhões férteis e sub-férteis, ratificando a classificação destes animais quanto à sua taxa de fertilidade. Da mesma forma, constatou-se que, com exceção dos porcentuais de células com acrossoma e DNA íntegros, todos os parâmetros das amostras de sêmen colhidas durante a primavera/verão demonstraram redução acentuada após o procedimento de congelação, atingindo porcentuais abaixo daqueles obtidos após a congelação de sêmen eqüino indicados pelo Manual para Exame Andrológico do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Hoffman e Landeck (1999) relatam existência de diferenças na estrutura e na integridade funcional do acrossoma e da membrana plasmática decorrentes de alterações circanuais na composição do plasma seminal que interferem na superfície e na membrana espermática. Apesar da produção espermática e de testosterona apresentarem flutuações estacionais, interferindo de forma negativa na qualidade espermática de amostras de sêmen colhidas fora da estação de monta (JOHNSON, 1991), tem-se relatado que o período para congelação dessas células pode ocorrer durante os dias curtos onde se observou melhores resultados na concentração e motilidade espermática,

espermatozóides normais e menor quantidade de acrossomas defeituosos comparando-se com o período de maior luminosidade (JANETT et al.2003). De fato, Magistrini et al. (1987) relataram que a melhor congelabilidade do sêmen foi obtida durante o inverno, sugerindo a influência positiva da qualidade do plasma seminal na congelabilidade do sêmen. Apesar da congelação ter sido realizada em um período onde alguns autores relatam não ser apropriada, esperava-se que a adição de substâncias antioxidantes como trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E) e piruvato melhorassem a qualidade de alguns parâmetros seminais de amostras congeladas, uma vez que estas substâncias atuam como antioxidantes não-enzimáticas (SILVA et al., 2006). Talvez outros fatores tenham interferido de forma negativa na qualidade seminal pós-congelação que não apenas a ação de ROS.

Segundo Bruemmer et al. (2001), a adição de 2 mM de piruvato ao sêmen refrigerado de eqüino melhorou a motilidade espermática, aumentando a produção de embriões. Os resultados deste experimento corroboram com esses autores, uma vez que se constatou aumento no porcentual de células móveis após a adição de piruvato (2 mM), independente dos animais serem férteis ou sub-férteis. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que os espermatozóides necessitam de energia para superar o estresse do processo de congelação/descongelação (FABBROCINI et al., 2000), pois Sharma et al. (1996) verificaram que, após descongelação, apesar de alguns espermatozóides possuírem membranas intactas, estes se apresentavam imóveis devido à sua reduzida capacidade metabólica. Piruvato é responsável pela produção de ATP a partir da degradação glicolítica da glicose, todavia, ao contrário da motilidade total, a adição de piruvato não preservou os porcentuais de motilidade progressiva dos espermatozóides colhidos de eqüinos férteis e sub-férteis, conforme observado por Bruemmer et al. (2001), além de não ter sido capaz de preservar a membrana plasmática contra a ação do provável aumento da produção de oxidantes decorrentes da congelação/descongelação, reduzindo a concentração de proteína do choque térmico (CAO et al., 2003).

De Lamirande e Gagnon (1992) observaram que a adição de piruvato (10 mM) em amostras refrigeradas de sêmen eqüino reduziu a motilidade espermática, resultado contrário encontrado neste experimento. No entanto, Upreti et al. (1997) relataram que o piruvato (5mM) age como antioxidante durante a congelação de sêmen ovino. As

diferenças de resultados podem ocorrer pelo fato de na congelação/descongelação observar-se maior decréscimo na fluidez da membrana plasmática do que após a refrigeração (CHATTERJEE e GAGNON, 2001), sendo requerida, nesta última, menor quantidade de antioxidante.

Em virtude da vitamina E ser protetora primária das membranas e, provavelmente, não possuir ação direta no metabolismo espermático, esta vitamina e seus derivados têm sido adicionadas a diluidores de sêmen de várias espécies, apesar do efeito na motilidade espermática durante o período de congelação/descongelação ter variado de acordo com a espécie (ALMEIDA e BALL, 2005). Neste experimento, ao contrário do esperado, a adição de trolox não determinou efeito benéfico na motilidade total e progressiva de espermatozóides de garanhões férteis e sub-férteis após a descongelação.

A vitalidade espermática, avaliada através da combinação de sondas fluorescentes IP/SYBR-14 em amostras de sêmen fresco e descongelado de várias espécies (GARNER e JOHNSON, 1995; BRINSKO et al., 2000) é indicativo do potencial fertilizante destas células. Neste experimento, como já era esperado, observou-se que amostras de sêmen colhidas de reprodutores férteis apresentaram maior porcentual de células viáveis, quando comparadas àquelas obtidas de garanhões sub-férteis. Acredita-se que a fraca vitalidade dessas células pode ser porque no sêmen de animais sub-férteis a qualidade é baixa, independente da ação de ROS. Todavia, acreditava-se que a adição do análogo da vitamina E (trolox), preservasse a integridade da membrana espermática das células espermáticas desses garanhões.

Maior desordem dos lipídios membranares foi observada para as amostras conservadas sem antioxidantes (Controle) e, apesar de não ter havido diferença estatística entre tratamentos e entre grupos de fertilidade, notou-se tendência de maior estabilidade membranar nas amostras conservadas com trolox, pois para os animais férteis verifica-se correlação entre a estabilidade membranar e a integridade do DNA ($r=0,57$; $p<0,05$), contrariamente às com piruvato, em que a correlação encontrada é negativa ($r=-0,53$; $p<0,05$) e contrariamente aos animais sub-férteis onde não se verificou qualquer correlação entre a estabilidade membranar e as outras variáveis analisadas.

Alterações bioquimicamente definidas nas atividades da cadeia respiratória são geralmente associadas com desordens mitocondriais (LUFT e LANDAU, 1995). A ação

da ROS pode afetar adversamente a motilidade espermática através de alteração da função mitocondrial. Por isso, o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) tem sido usado para mensurar a função mitocondrial (BAUMBER et al., 2000) através de sondas IP/SYBR-14 associado ao JC-1 (HUO et al., 2002; LOVE et al., 2003; KIRK et al., 2005). Nesse experimento não foi detectada nenhuma diferença significativa entre os grupos Controle e aqueles suplementados com trolox ou piruvato, supondo-se que o tipo de antioxidante ou a sua concentração não foram adequados para minimizar o efeito do estresse oxidativo a que as células foram submetidas durante o processo de congelação. Todavia, observou-se superioridade dos garanhões férteis em relação aos sub-férteis, corroborando com os relatos de Baumber et al. (2000).

Os porcentuais de células com acrossomas íntegros utilizando piruvato foram menores no grupo dos férteis e maiores no dos sub-férteis. Alguns autores relataram que homens inférteis com parâmetros seminais anormais possuem capacidade reduzida do equilíbrio entre a produção de oxidante total e a capacidade antioxidante do plasma seminal (LEWIS et al., 1995; RHEMREV et al., 2000). Christophe et al. (1998) relataram que pacientes sub-férteis apresentaram desequilíbrio entre o excesso de estresse oxidativo e a capacidade antioxidante em relação aos homens férteis, e que após a suplementação alimentar com substâncias antioxidantes esses pacientes apresentaram elevação na concentração espermática e redução na concentração de DNA oxidado. Da mesma forma, Comhaire e Mahmoud (2003) provaram que a suplementação com algumas substâncias como tocoferol, ácido fólico, astaxantina, carnitina e zinco aumentaram a qualidade espermática de homens sub-férteis. Talvez isso explique a melhora da integridade acrossomal ter sido maior nos animais sub-férteis desse experimento, parecendo que eles estão mais susceptíveis à ação de antioxidantes do que os férteis.

Neste experimento, apesar de não se constatar diferença estatística significativa no grupo dos animais sub-férteis, observou-se maiores porcentuais de células com DNA íntegros nas amostras suplementadas com antioxidantes. Segundo Wang et al. (2003) existe correlação positiva entre o aumento do porcentual de dano espermático, indicado pelo aumento do estresse oxidativo, e apoptose mediada por caspase em pacientes com fator de infertilidade masculina. Assim, antioxidantes utilizados com o objetivo de reduzir ou inibir a produção de ROS podem determinar menos apoptose e, assim,

aumentar a qualidade espermática através da redução de danos ao DNA. O fato da melhora na integridade do DNA ter ocorrido apenas nos espermatozóides sub-férteis concorda com Donelly et al. (1999), ao relatarem que a adição de ascorbato ou α-tocoferol na preparação do meio diluidor não apresentou efeito positivo quando os espermatozóides possuíam ≥ 80% DNA íntegros, apesar desses antioxidantes promoverem decréscimo na produção de ROS.

Segundo Baumber et al. (2000), a motilidade espermática eqüina pode ser afetada por um mecanismo de ação de ROS, independente da peroxidação lipídica e das funções dependentes da membrana mitocondrial. Talvez isso explique o fato de que a adição de piruvato tenha causado efeito positivo apenas na motilidade total dos espermatozóides, pois se trata de um substrato energético, sendo sua ação como antioxidante limitada por não ter causado melhora em outros parâmetros seminais testados.

Quando ocorre desequilíbrio na concentração de ROS observa-se redução na capacidade fertilizante dos espermatozóides. Na literatura ainda não existe consenso quanto à dosagem e ao tipo de antioxidante ideal para cada espécie. Talvez pelo fato de utilizarem metodologias variadas, formas diferentes de avaliação espermática e diferenças na congelabilidade do sêmen quanto à raça e aos ejaculados dos animais.

As diferenças estatísticas não significativas observadas nesse experimento podem estar relacionadas à observação dos parâmetros terem sido realizados logo após a descongelação, não dando tempo suficiente dos antioxidantes agirem na célula espermática descongelada.

Por conseguinte, conclui-se que piruvato melhora a motilidade espermática em garanhões férteis e sub-férteis e que os antioxidantes piruvato e trolox utilizados na dosagem 2mM e 120 mM, respectivamente, não preservam os parâmetros seminais de eqüinos submetidos à congelação/descongelação durante a primavera/verão na região de clima mediterrâneo. Novas pesquisas utilizando esse protocolo no período de inverno são necessárias para uma melhor avaliação da ação desses antioxidantes na preservação, pós-criopreservação, da viabilidade espermática de garanhões.

5 Agradecimentos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico) pela bolsa de estudo durante a realização do doutorado; à Capes, pela concessão de Bolsa para realização de Doutoramento sanduíche; à Universidade de Coimbra e ao Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior Agrária de Coimbra, pelo uso dos garanhões nesse estudo além da assistência científica.

6 Referências

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

ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effect of α-tocopherol and tocopherol succinato on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 87, p. 321-337, 2005.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion semen. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 7, p. 145-173, 1987.

BAUMBER, J.; BALL, B.A; CURTIS, G. et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membrane potencial, and membrane lipid peroxidation. **J. Androl.,** v. 21, n. 6, p. 895-901, 2000.

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

BLOTTNER, S.; WARNKER, C.; TUCHESCHERER, A. et al. Morphological and and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **An. Reprod. Sci.**, v. 65, p. 75-88, 2001.

BRINSKO, S.P.; Van WAGNER, G.S.; GRAHAM, J.K. et al. Motility, morphology, and triple stain analysis of fresh, cooled, and frozen-thawed stallion sperm. **J. Reprod. Fertil. Suppl**, v. 56, p. 111-120, 2000.

BRUEMMER, J.E.; COY, R.C.; SQUIRES, E.L. et al. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. **J. Anim. Sci.**, v. 80, p. 12-18, 2001.

CAO, W.L.; WANG, Y.X.; XANG, Z.Q. et al. Cryopreservation-induced decrease in heat-shock protein 90 in human spermatozoa and its mechanisms. **Asian J. Androl**., v. 5, p. 43-46, 2003.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R. et al. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **J. Androl.**, v. 14, p. 289-297, 1993.

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

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

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

CLAY, C.M.; CLAY, J.N. Endocrine and testicular changes associated with season, artificial photoperiod and the peri-pubertal period in stallion. In: BLANCHARD, TL, VARNER, DD (Eds) Stallion management. **Vet. Clin. North Amer.,** v. 8, p. 31-56, 1992.

CHRISTOPHE, A.; ZALATA, A.; MAHMOUD, A. et al. Fatty acid composition of sperm phospholipids and its nutritional implications. **Middle East Fertil. Soci. J.**, v. 3, p. 46-53, 1998.

CRISTOVA, Y; JAMES, P.S.; JONES, R. Lipid difusión in sperm plasma membranas exponed to peroxidative injury from oxygen free radicals. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 68, p. 365-372, 2004.

De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **J. Androl.**, v. 13, p. 379-386, 1992.

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

De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A. et al. Reactive oxygen species and sperm phisiology. **J. Reprod. Fertil. Reviews of Reprod.**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DONNELLY, E.T.; Mc CLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effect of ascorbate and α-tocoferol supplementation *in vitro* on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. **Mutagenesis**, v. 14, n. 5, p. 501-511, 1999.

FABBROCINI, A.; Del SORBO, C.; FASANO, G. et al. Effect of diferencial addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of mediterranean buffalo (B. bubbalis) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 193-207, 2000.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR14 and propidium iodide. **Biol. Reprod.**, v. 53, p. 276-284, 1995.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (revisão de literatura). **Rev. Brasil. Reprod. Anim.,** v. 28, n. 4. P. 1-9. 2004.

HOFFMANN, B.; LANDECK, A. testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. **Animal Reprod. Sci.**, v. 57, p. 89-98, 1999.

HUO, L.J.; MA, X.H.; YANG, Z.M. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrossome intactness in extended boar semen during long-term storage. **Theriogenology**, v. 58, p. 1349-1360, 2002.

JANETT, F.; THUN, R.; BETTSCHEN, S.;BURGER, D.; HASSIG, M. Seasonal changes of sêmen quality and freezability in franches-montagnes stallions, **Anim. Reprod. Sci.**, v. 22, p. 213-221, 2003.

JASKO, D.J.; MORAN, D.M; FARLIN, M.E. et al. In: 38th Annual AAEP Convention Proceedings. Pregnancy rates utilizing fresh cooled and frozen-thawed stallion sperm 1992, p. 649-660.

JOHNSON, L. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. **Biol. Reprod.**, v. 44, p. 284-291, 1991.

KIRK, E.S.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Comparision of in vitro laboratory analysis with the fertility of criopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, p. 1422-1439, 2005.

LEME, D.P.; PAPA, F.O.; ROSER, J.F. et al. Sazonalidade reprodutiva de garanhões nos trópicos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**., v. 27, n. 2, p. 207-209, 2003.

LEWIS, S.; BOYLE, P.; McKINNEY, M.B. et al. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. **Fertil. Steril.**, v. 64, p. 868-870, 1995.

LOVE, C.C.; THOMPSON, J.A.; BRINSKO, S.P. et al. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. **Theriogenology**, v. 60, p. 1127-1138, 2003.

LUFT, R.; LANDAU, B.R. Mithocondrial medicine. **J. Intern. Med.**, v. 238, p. 405-421, 1995.

Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), Minas Gerais**,** 2ª ed., 49 p., 1998.

MAGISTRINI, M.; CHANTELOUBE, Ph.; PALMER, E. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. **J. Reprod. Fert. Suppl.**, v. 35, p. 127-133, 1987.

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

O´DONNELL-TORMEY, J.; NATHAN, C.F.; LANKS, K. et al. Secretion of pyruvate: an antioxidant defence of mammalian cells. **J. Exp. Med.**, v. 165, p. 500-514, 1987.

PADILLA, A.W.; FOOTE, R.H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. **J. Anim. Sci.**, v. 69, p. 3308-3310, 1991.

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction, AI, USA, p. 377-378, 1984.

RHEMREV, J.P.; Van OVERVELD, F.W.; HAENEN, G.R. et al. Quantification of the nonenzymatic fast and slow TRAP in a post addition assay in human seminal plasma and the antioxidant contribution of various seminal compounds. **J. Androl.**, v. 21, p. 913-920, 2000.

SAILER, B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the present of DNA stand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. **J. Androl.**, v. 16, n.1, p. 80-87, 1995.

SALAHUDEEN, A.K.; CLARK, E.C.; NATH, K.A. Hydrogen peroxide-induced renal injury. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1886-1893, 1991.

SAMPER, J.C.; HELLANDER, J.C.; CRABO, B.G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion sperm and sperm quality. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 44, p. 107-114, 1991.

SILVA, P.F.N. **Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm**. 178 p. PhD Thesis, Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, 2006.

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

SHARMA, S.K.; TOLENTINO, M.V.; AGARWAAL, A. Sperm kinematics of cryopreserved normozoospermic specimens after artificial stimulation. **Urology**, v. 47, p. 77-81, 1996.

TWIGG, J.; IRVINE, D.S.; HOUSTON, P. et al. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 4, p. 439-445, 1998.

UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R. et al. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **An. Reprod. Sci.**, v. 51, p. 275-287, 1997.

VARMA, S.D.; DEVAMANOHARAN, P.S.; MORRIS, S.M. Photoinduction of cataracts in rats lans *in vitro*: preventive effect on pyruvate. **Exp. Eye Res.**, v. 50, p. 805-812, 1990.

VIDAMENT, M.; YVON, J.M.; COUTY, I. et al. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. **An. Reprod. Sci.**, v. 68, p. 201-218, 2001.

WANG, X.; SHARMA, R.K.; SIKKA, S.C. et al. Oxidative stress is associated with increased DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertil. Steril.**, v. 80, n. 3, p. 531-535, 2003.

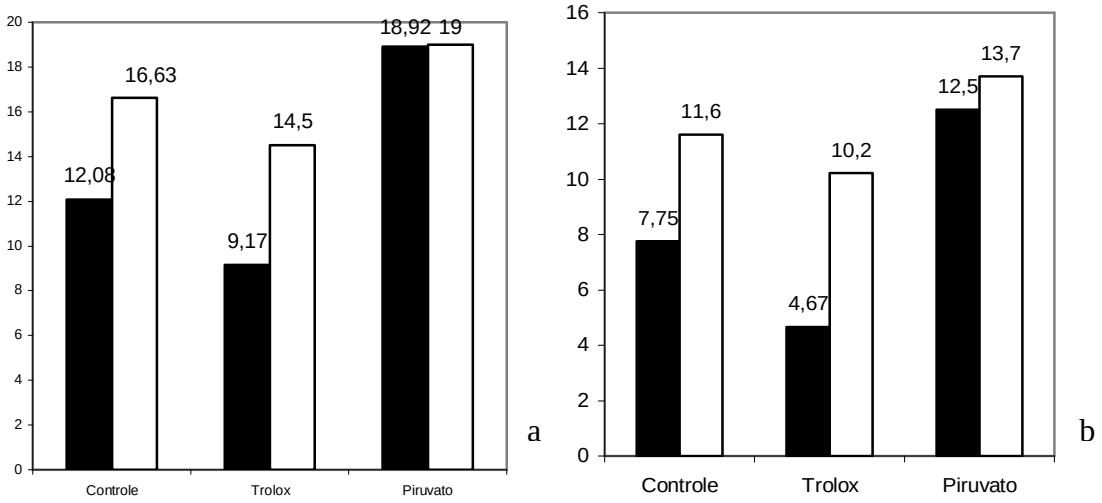

Fig. 1. Porcentuais de células espermáticas com motilidade total (a) e progressiva (b) colhidas de reprodutores equinos férteis (■) e sub-férteis (□), após a congelação utilizando o diluente INRA 82 suplementados com Trolox ou Piruvato.

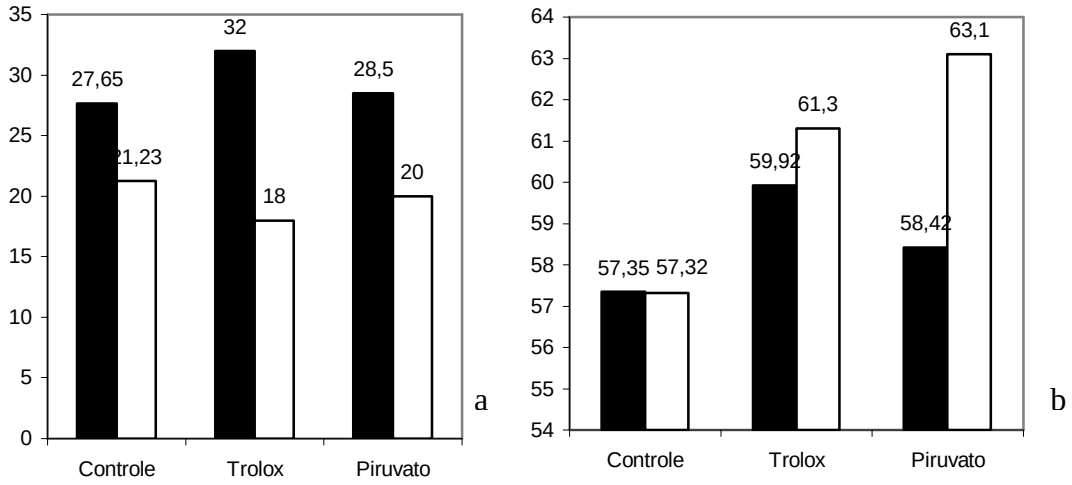

Fig 2. Porcentuais de células espermáticas com vitalidade (a) e estabilidade de membrana (b), colhidas de reprodutores equinos férteis (■) e sub-férteis (□), após a congelação utilizando o diluente INRA 82 suplementados com Trolox ou Piruvato.

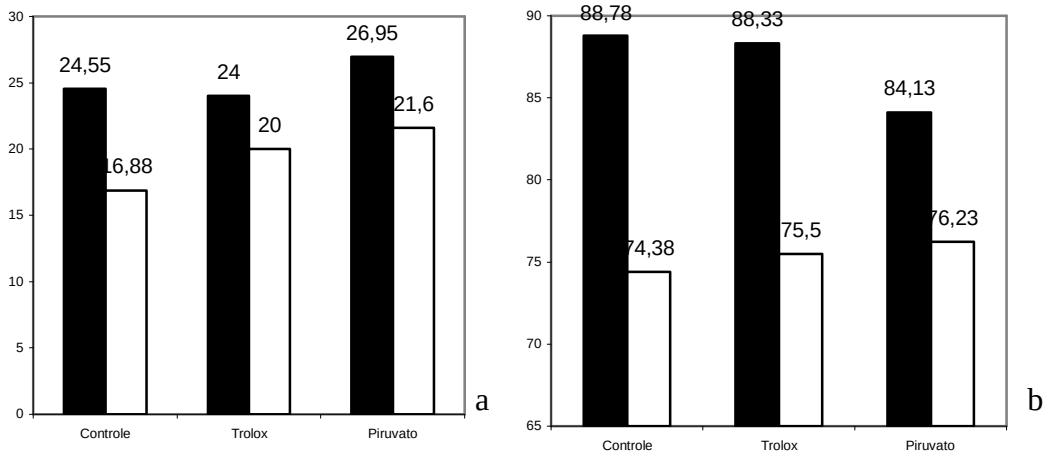

Fig. 3. Porcentuais de células espermáticas com elevado potencial mitocondrial (a) e com acrossoma íntegro (b), colhidas de reprodutores equinos férteis (■) e sub-férteis (□), após a congelação utilizando o diluente INRA 82 suplementados com Trolox ou Piruvato.

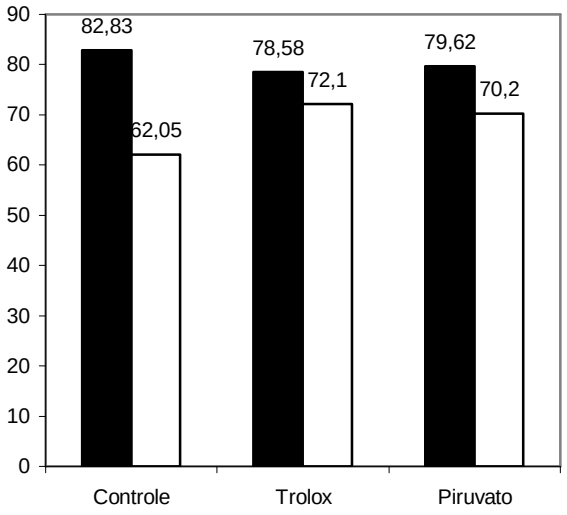

Fig. 4. Porcentuais de células espermáticas DNA íntegros, colhidas de reprodutores eqüinos férteis (■) e sub-férteis (□), após a congelação utilizando o diluente INRA 82 suplementados com Trolox ou Piruvato.

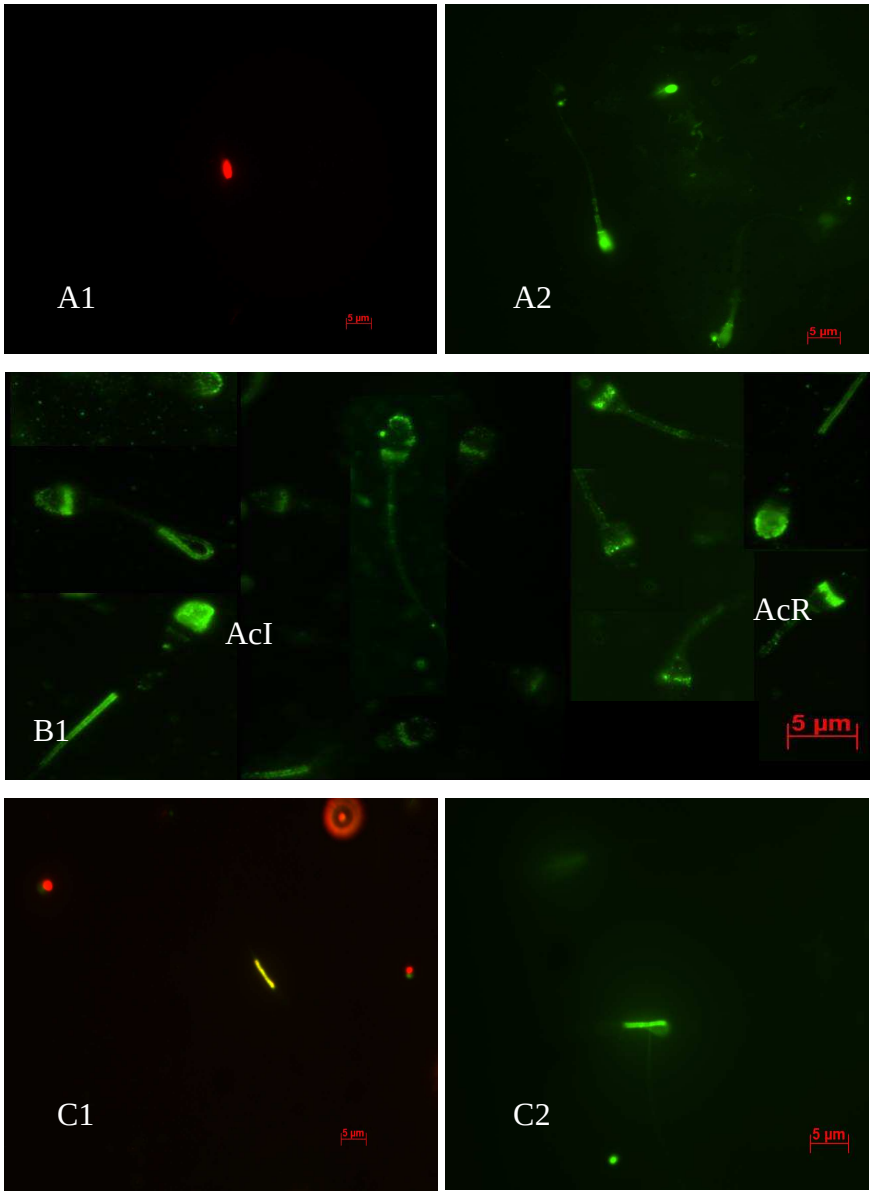

Fig. 8. Espermatozóides com membrana espermática lesada (A_1) e íntegra (A_2) corados com IP + SYBR. B_1 = Espermatozóides com acrossomas reagidos (AcR) e acrossomas intactos (AcI), corados com FITC-PSA. Espermatozóides com alto potencial mitocondrial (C_1) e baixo potencial mitocondrial (C_2), avaliados através de JC-1.

3.3 Efeito da adição de Trolox e Pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozóides eqüinos após descongelação

(Effect of Trolox and Pentoxifylline addition on motility, acrosomal and DNA integrity on equine sperm after thawing)

K.M.G. Silva[a5], T.A.P. Moraes[a], E.C.B. Silva[a], S. C. Gamboa[b], M.M.P. Guerra[a]

[a]*Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;*

[b]*Laboratório de Reprodução Animal, Departamento de Ciências Zootécnicas, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra, Bencanta, 3040-316 Coimbra, Portugal;*

Resumo

Três garanhões foram utilizados para estudar o efeito da adição de Trolox e Pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e DNA de espermatozóides após descongelação. Para congelação utilizou-se diluente Tris-gema com glicerol a 5% em máquina de congelação de sêmen e descongeladas a 37 ºC durante 30 segundos sendo adicionado, em seguida, aos tratamentos: T1= 150 µL de sêmen + 150 µL de Tris (Controle); T2= 150 µL de sêmen + 150 µL de Tris + 120 µM/mL de Trolox; T3= 150 µL de sêmen + 150 µL de Tris + 3,5 mM de Pentoxifilina e T4= 150 µL de sêmen + 150 µL de Tris + 3,5 mM de Pentoxifilina + de 120 µM/mL Trolox. Foram analisadas nos momentos 0, 60 e 120 minutos de incubação em banho-maria (37 ºC). Imediatamente após a descongelação e diluição e após 60 minutos de incubação não se evidenciou diferença estatística (P>0,05). Após 120 minutos de incubação, verificou-se maior porcentual (P<0,05) de células com motilidade total e progressiva nas amostras diluídas com T2. A adição de Trolox ao diluente após a descongelação do sêmen eqüino preserva a motilidade total e progressiva das células espermáticas submetidas à incubação a 37 ^{o}C durante 120 minutos.

Palavras-chave: Sêmen, antioxidante, congelação, eqüino.

Abstract

Three stallions race was used to study the effect of Trolox and Pentoxifylline addition in the motility, acrosome and DNA integrity of equine spermatozoa after freezing. Tris-egg-yolg with 5% glycerol diluent was used in semen freezing machine

[5] Rua dos navegantes, 1907/701, Boa Viagem, Recife-PE, CEP: 51021-010. Tel.: 55-81-34679886; E-mail: karenmascaro1@hotmail.com (K.M.G. Silva)

and thawing at 37 ^{o}C during 30 seconds and then, added with treatments: T1= 150 µL of semen + 150 µL Tris (Control); T2= 150 µL of semen + 150 µL Tris +150 mM/mL of Trolox; T3= 150 µL of semen + 150 µL Tris +3,5 mM of Pentoxifylline, T4= 150 µL of semen + 150 µL Tris +3,5 mM of Pentoxifylline + 150 mM of Trolox. The samples were analyzed at 0, 60 and 120 minutes of incubation in water-bath (37°C). Immediately after thawing and dilution, as well as after 60 minutes of incubation, there was no significant difference (P>0.05). However, after 120 minutes of incubation, it was observed higher percentage (P<0.05) of cells with total and progressive motility on the samples diluted with T2. It can be concluded that Trolox added to equine diluent after thawing preserve total and progressive motility of the sperm cells incubated at 37 ^{o}C during 120 minutes.

Keywords: Semen, antioxidant, freezing, equine.

Introdução

Na maioria dos animais da espécie eqüina as características espermáticas pós-congelação apresentam características inadequadas resultando em índices baixos de fertilidade, como conseqüência das crioinjúrias espermáticas ocorridas durante o processo de congelação/descongelação. Por isso, várias pesquisas têm sido realizadas com o intuito de melhorar a qualidade espermática e as taxas de prenhez nesta espécie.

O papel de espécies de oxigênio reativo (ROS) tem sido enfatizado na fisiopatologia da reprodução e, apesar de estar envolvido no controle fisiológico de algumas funções espermáticas, como capacitação e reação do acrossoma, a sua produção excessiva é prejudicial em virtude de reduzir a motilidade espermática, a capacidade de fusão dos gametas e a fertilidade (GUERRA et al., 2004). Sabe-se que muitos procedimentos utilizados em laboratório podem interferir na produção de ROS espermáticos, tendo sido demonstrado aumento de sua concentração em amostras de sêmen dos animais domésticos submetidos à centrifugação (TWIGG et al., 1998) e congelação (WANG et al., 1997; BALL et al., 2001; CHATTERJEE e GAGNON, 2001).

Durante a congelação, a produção de ROS pode induzir mudanças na estrutura e na função espermática (BALL et al., 2001), além de alterar o sistema de defesa antioxidante (BILODEAU et al., 2000). Por isso, Gadea et al. (2005) visando aumentar

a viabilidade e a subseqüente capacidade fertilizante de espermatozóides de suínos, sugeriram a adição de antioxidante ao meio diluidor após a descongelação, em virtude de reduzir a produção de ROS e aumentar a habilidade de penetração no oócito.

Os antioxidantes são inibidores de radicais livres que suprimem a formação de ROS e/ou suas ações. Estudos têm mostrado que a vitamina E (α-tocoferol) é capaz de interagir diretamente com radicais oxidantes (JONES et al., 1995) interrompendo a reação em cadeia da peroxidação lipídica em biomembranas e lipoproteínas (DIEBER-ROTHENEDER et al., 1991), protegendo as células de estresse oxidativo (KAGAN et al., 1992) e de danos das membranas plasmática e acrossomal, bem como do DNA (SIKKA, 2004).

A pentoxifilina está sendo utilizada nos casos de infertilidade causada por fator masculino na espécie humana, levando em consideração a sua capacidade de preservar a capacidade fertilizante dos espermatozóides (GOULART et al., 2004). Segundo Yovich (1993), este inibidor da fosfodiesterase auxilia na fertilização do ovócito durante os procedimentos de fertilização *in vitro*, promovendo aumento da motilidade destes gametas. No sêmen eqüino, a pentoxifilina aumentou a motilidade progressiva do sêmen descongelado após incubação nos momentos 0 e 120 minutos (MARQUES et al., 2002).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de Trolox e Pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozóides eqüinos após descongelação.

Material e Métodos

Amostras de sêmen foram obtidas de três garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idades variando entre quatro e oito anos, os quais permaneceram estabulados no Haras Aparthorse (Camaragibe-PE) durante o experimento (junho e julho), sendo alimentados com ração balanceada e feno. Os animais foram avaliados através de exame andrológico, sendo aprovados para congelação apenas os ejaculados com valores mínimos de 60,0% de motilidade total e 3,0 de vigor espermático.

A cada três dias foram colhidas amostras de sêmen, totalizando três ejaculados de cada reprodutor, através do uso da vagina artificial (modelo Botucatu), com auxílio de uma égua em cio. Imediatamente após a colheita, procedeu-se à filtragem das amostras

de sêmen com gaze, visando remover o gel e as partículas grandes de *debris* celulares. As amostras sem gel foram colocadas em banho-maria a 35 ^{o}C durante os procedimentos de diluição e análise espermática: motilidade total e progressiva, e concentração espermática que foram avaliadas segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (MEAASA-CBRA, 1998).

Em seguida, o sêmen foi diluído [1:1, sêmen:diluidor (Kenney, 1975)] e transportado, à temperatura ambiente, ao laboratório de Andrologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), localizado há 15 minutos do Haras Aparthorse, para posterior congelação.

Foram preparadas as amostras de sêmen *in natura* para avaliação de: a) integridade de acrossoma, onde 10 µL do sêmen diluído 1:1 foi utilizado para confecção de estiraços, os quais foram armazenados a 4 ^{o}C, protegidos da luz e analisados no prazo de duas semanas utilizando-se a técnica de coloração *FITC*-conjugada ao *Pisun sativun* aglutinina[6] (FITC-PNA; ROTH et al., 1998); b) integridade do DNA, onde alíquota de 10µL de sêmen foi diluída em 990 µL de solução de TNE (0,15M NaCl; 0,01 M TRIS.HCl; 1mM EDTA.Na_2.$2H_2O$; q.s.p. 100mL, pH de 7,4), em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e incubados a - 20 ^{o}C, para posterior análise de acordo com a técnica de Laranja de Acridina[7] (Evenson et al., 1999).

Antes do procedimento de congelação, as amostras de sêmen foram centrifugadas (600xg, durante 10 minutos) para retirada do plasma seminal e os *pellets* foram re-suspensos em diluidor de congelação FR5[8] (Tris-gema com 5% de glicerol), na concentração de $100x10^6$ espermatozóides/mL. A seguir, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25mL e transferidas imediatamente para a máquina de congelação de sêmen (modelo Tetakon® - TK 3000, Tecnologia em Congelação Ltda), onde foram submetidas ao processo de refrigeração do sêmen iniciando à temperatura ambiente até atingir 5 ^{o}C, a uma taxa de 0,25 ^{o}C/min. A partir daí, foram realizadas duas curvas negativas, a primeira de -15 ^{o}C/min e a segunda a -10 ^{o}C/min até atingir – 120 ^{o}C. Após o processo de congelação, as palhetas foram armazenadas em botijão criobiológico à temperatura de -196 °C.

---

[6] Sigma – Saint Louis, MO, USA
[7] Molecular Probes Inc., USA
[8] NUTRICELL, Brasil

Para descongelação, duas palhetas de sêmen de cada reprodutor foram colocadas a 37 ºC, durante 30 segundos. Em seguida, as amostras foram diluídas em solução Tris (1:1;v:v) acrescida de Trolox e Pentoxifilina de acordo com os seguintes tratamentos: T1= 150 μL de sêmen + 150 μL de Tris (Controle); T2= 150 μL de sêmen + 150 μL de Tris + 120 μM/mL de Trolox[9]; T3= 150 μL de sêmen + 150 μL de Tris + 3,5 mM de Pentoxifilina[10] e T4= 150 μL de sêmen + 150 μL de Tris + 3,5 mM de Pentoxifilina + de 120 μM/mL Trolox. As amostras foram analisadas quanto a motilidade (total e progressiva), vigor e integridade de acrossoma e DNA, nos momentos 0, 60 e 120 minutos de incubação a 37 ^{o}C em banho-maria. A concentração utilizada para Pentoxifilina foi baseada segundo estudos de Marques et al. (2002) e a de Trolox, segundo estudos prévios em nosso laboratório utilizando sêmen resfriado eqüino.

As características espermáticas (motilidades total e progressiva, vigor, integridade acrossomal e integridade de DNA) de cada reprodutor foram avaliadas antes e após a congelação, bem como após diluição e incubação de 60 e 120 minutos. Diferenças entre médias foram testadas através da análise de variância (ANOVA) considerando os fatores tratamento e tempo de incubação das amostras, e a interação entre os dois. Significância estatística foi estabelecida em nível de 0,05 de probabilidade.

Resultados e Discussão

Ao se avaliar a interação tratamento x tempo, não se constatou diferença significativa para nenhuma variável estudada. A análise das amostras de sêmen de eqüinos realizada imediatamente após a descongelação e diluição não evidenciou diferença estatística significativa (P>0,05) entre os tratamentos T1 (Tris), T2 (Tris + 120 μM/mL Trolox), T3 (Tris + 3,5 mM Pentoxifilina) e T4 (Tris + 120 μM/mL Trolox + 3,5 mM Pentoxifilina) para todos os parâmetros avaliados (motilidade total e progressiva, vigor, integridade de acrossoma e DNA) (Figs. 1 e 2).

Da mesma forma, após 60 minutos de incubação a 37 ^{o}C, não se constatou diferença estatística significativa entre tratamento T1, T2 , T3 e T4, para motilidade

[9] Sigma, USA
[10] A Fórmula, Brasil

total, motilidade progressiva, vigor, porcentagem de células com acrossomas e DNA íntegros (Figs. 1 e 2).

Depois de 120 minutos de incubação, verificou-se diferença estatística significativa (P<0,05) na motilidade total, sendo o grupo T2 (53,3%) superior ao T1 (35,0%) e ao T3 (31,7%) (Fig. 1), e na motilidade progressiva, sendo T2 (40,0%) superior a T1 (30,0%) e T3 (21,7%) (Fig. 1). Na variável vigor, houve aumento nos valores aos 120 minutos de incubação nos tratamentos T2 (3,3) e T4 (3,3). Resultado contrário no T3, com aumento aos 60 minutos de observação (3,3) e redução após 120 minutos (2,0) (Fig. 2).

Os resultados obtidos demonstraram que as médias de motilidade total e progressiva (Fig. 1) mantiveram-se superiores ao valor mínimo de 30% sugerido pelo MEAASA-CBRA (1998), exceto para a motilidade progressiva no T3 aos 120 minutos. Em geral, o T2 determinou melhores resultados para motilidade total e progressiva do sêmen tratado pós-descongelação e avaliado após 120 minutos de incubação, demonstrando ação do Trolox sob a melhoria da motilidade espermática de sêmen descongelado de eqüinos. A vitamina E não apenas capta radicais de oxigênio da membrana, mas intercepta os radicais peroxil lipídicos importantes na propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Assim, a vitamina E demonstrou ter capacidade de proteção contra ataque oxidativo tanto nos estudos *in vivo* (MICKLE et al., 1997) quanto *in vitro* (WU et al., 1990), sendo, portanto, recomendada a administração deste antioxidante ao sêmen no momento da inseminação visando preservar a sua motilidade por até duas horas no ambiente uterino.

Segundo Marques et al. (2002), a adição de 3,5 mM de pentoxifilina (inibidor da fosfodiesterase), com ou sem ácido ascórbico, em diluidor TALP após congelação do sêmen eqüino criopreservado em diluidor à base de gema de ovo (20,0%) e Orvus-Es Past, agente emulsificante que aumenta a proteção dos fosfolipídios, preservou a motilidade progressiva e o vigor espermático nos momentos 0 ou após 120 minutos de incubação. Resultado contrário ao observado no presente experimento, onde tanto a motilidade total quanto a motilidade progressiva e o vigor foram menores aos 120 minutos de incubação utilizando esse antioxidante. As diferenças de resultado podem estar relacionadas ao tipo de diluidor utilizado no experimento anteriormente citado,

pois ele contém substâncias que ajudam a manter a qualidade espermática após o processo de congelação/descongelação como o porcentual alto de gema de ovo e o Orvus-Es-Past.

Observou-se redução significativa (P<0,01) nos porcentuais de células com acrossomas íntegros em decorrência do tempo de incubação, sendo mais acentuada após 120 minutos no T3 (90,0%; 89,0%; 78,0%) e em menor intensidade no T4 (93,0%; 87,5%; 87,0%), respectivamente, aos 0, 60 e 120 minutos de incubação (Fig. 2).

A peroxidação lipídica é iniciada pelo radical hidroxil que reage com o ácido graxo poliinsaturado gerando radicais orgânicos livres que, em contrapartida, reage rapidamente com o oxigênio para formar o peróxido de hidrogênio. Esses peróxidos lipídicos que agem como radicais livres, iniciam uma reação em cadeia autocatalítica, resultando em danos à membrana celular (COTRAN et al., 1989). A peroxidação lipídica e subseqüente dano de membrana ocorrem principalmente durante o processo de descongelação (SINHA et al., 1996). O estudo da integridade acrossomal evidenciou porcentuais elevados de células íntegras no decorrer dos intervalos estudados, demonstrando que neste experimento todos os tratamentos proporcionaram ambiente adequado à integridade das membranas plasmática e acrossomal externa, evitando um significante dano celular e aumento nas células espermáticas vivas capacitadas/acrossoma reagido comumente observadas durante o processo de congelação (NEILD et al., 2003) e diferindo dos relatos de que o acrossoma comumente sofre alteração estrutural determinada por elevadas concentrações de ROS (Marques et al., 2002).

No tratamento usando apenas Pentoxifilina (T3), após 120 minutos de incubação ocorreu redução acentuada dos valores em todos os parâmetros observados, mesmo sem diferença significativa (P>0,05), com exceção da análise do DNA que manteve 100,0% das células íntegras.

Baixa qualidade da cromatina detectada em espermatozóides morfologicamente anormais pode representar um dos maiores fatores limitantes da habilidade fertilizante do espermatozóide, dando ênfase assim à importância da integridade do DNA como expressão do potencial de fertilidade (FRASE, 2004). Todavia, neste experimento, a análise de integridade de DNA espermático não evidenciou diferença entre os tratamentos e os tempos de incubação, apresentando 100,0% de células íntegras e

demonstrando que o processo de congelação não danificou o material genético encontrado no núcleo deste gameta. Por isso, não foi necessária a ação protetora das substâncias Trolox e Pentoxifilina adicionadas após a descongelação, corroborando com Donelly et al. (1999) ao relatarem que a utilização de amostras contendo espermatozóides com mais de 80% de integridade de DNA, a adição de antioxidantes como ascorbato ou α-tocoferol não determinou efeito positivo na melhora dessa qualidade espermática, apesar desses antioxidantes promoverem decréscimo na produção de ROS.

Ao se observar os parâmetros espermáticos de acordo com o tempo de incubação, no tratamento contendo apenas Pentoxifilina (T3) constatou-se redução na média do valor de maneira mais acentuada do que nos demais tratamentos, inclusive no grupo controle. Entretanto, as amostras descongeladas e diluídas em Tris acrescido de Trolox apresentaram valores maiores aos 120 minutos de incubação, talvez pelo fato da vitamina E ser uma das mais importantes moléculas antioxidantes, residindo principalmente na membrana celular. Este análogo hidrossolúvel da vitamina E interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica e capta as ROS geradas durante a redução univalente do oxigênio molecular e durante a atividade normal da enzima oxidativa (EHRENKRANZ, 1980; PALAMANDA e KEHRER, 1993).

A associação de Trolox e Pentoxifilina (T4) conferiu melhores valores aos 120 minutos de incubação quando comparadas à adição de Pentoxifilina (T3) nas variáveis motilidades total e progressiva, vigor e integridade do acrossoma, e apenas numericamente superior aos resultados encontrados com o uso do Trolox (T2) aos 120 minutos de incubação para as variáveis, integridade do acrossoma e do DNA. Talvez a associação dos dois antioxidantes tenha potencializado a proteção das células expermáticas contra a ação de ROS uma vez que a Pentoxifilina pode ter propiciado importante redução nos radicais livres de oxigênio, que são deletérios para a atividade celular em experimento com sêmen resfriado de eqüino (GOULART et al., 2004).

Com isso pode-se concluir que a adição de 120 μM/mL de Trolox ao diluente utilizado após a descongelação do sêmen equino preserva a motilidade total e progressiva das células espermáticas submetidas à incubação a 37 ^{o}C durante 120 minutos. A associação de 120 μM/mL de Trolox e 3,5 mM de Pentoxifilina incubadas a 37 ^{o}C durante 120 minutos pode potencializar a ação antioxidante em amostras de

sêmen criopreservadas. O uso de antioxidantes pode ser utilizado após a descongelação, entretanto maiores estudos são necessários para suportar as duas últimas hipóteses.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro e à Médica Veterinária Ana Emília Motta (Aparthorse) pela concessão dos garanhões utilizados nesse estudo.

Referências Bibliográficas

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of rective oxygen species by equine spermatozoa. **Am .J. Vet. Res.**, v. 62, n. 4, p. 508-515, 2001.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C. et al. Levels of antioxidants defences are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 55, p. 282-288, 2000.

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

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Pathologic basis of diseases**, 4.ed. Philadelphia: W.B. Sounders Co., 1989. 97p.

DIEBER-ROTHENEDER, M.; PUHL, H.; WAEG, G. et al. Effect of oral supplementation with d-α-tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. **J. Lipid Res.**, v. 32, p. 1325-1332, 1991.

DONNELLY, E.T.; Mc CLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effect of ascorbate and α-tocoferol supplementation *in vitro* on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. **Mutagenesis**, v. 14, n. 5, p. 501-511, 1999.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Hum. Reprod.**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

EHRENKRANZ, R. Vitamin E and the neonate. **Am. J. Dis. Child**., v. 134, p. 1157-1168, 1980.

FRASE, L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. **Polish J. of Vet. Sci.**, v. 7, n. 4, p. 311-321, 2004.

GADEA, J.; GUMBAO, D.; MATÁS, C. et al. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the *in vitro* fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. **J. Androl.**, v. 26, n. 6, p. 749-756, 2005.

GOULART, H.M.; SILVA, A.E.D.F.; McMANUS, C.; PAPA, F.O. Efeitos da Pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozóides de equinos, após o resfriamento a 5 ^{0}C, **R. Bras. Zootec.**, v. 33, n. 1, p. 112-122, 2004.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (revisão de literatura). **Rev. Bras. Reprod. Anim.,** v. 28, n. 4, p. 189-196, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3ed. Oxford , New York: Clarendon Press; Oxford University Press, 1999. 67p.

JONES, D.P.; KAGAN, V.E.; AUST, S.D. et al. Impact of nutrients on cellular lipid peroxidation and antioxidant defence system. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 26, p. 1-7, 1995.

KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; FORTE, T. et al. Recycling of vitamin E in low density lipoproteins. **J. Lipid. Res**., v. 33, p. 385-397, 1992.

KENNEY, R.M.; BERMAN, R.V.; COOPER, W.L. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTIONERS, 21, 1975, Boston. **Proceedings ...**, Boston, 1975. p.327-36.

Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), Minas Gerais**,** 2ª ed., 49 p., 1998.

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

MICKLE, D.A; LI, R.K.; WEISEL, R.D. et al. Miocardial salvage with trolox and ascorbic acid for an acute envolving infarction. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 47, p. 203-213, 1997.

NEILD, D.M.; GADELLA, B.M.; CHAVES, M.G; MIRAGAYA, M.H.; COLEMBRANDER, B.; AGÜERO, A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 59, p. 1693-1705, 2003.

PALAMANDA, J.R.; KEHRER, J.P. Involvement of vitamin E and protein thiols in the inhibition of microssomal lipid peroxidation by glutathione. **Lipids**, v. 28, p. 427-431, 1993.

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

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

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

YOVICH, J.L. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. **Hum. Reprod.**, v. 8, p. 1786-1791, 1993.

TWIGG, J.; IRWINE, D.S.; HOUSTON, P. et al. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 4, p. 439-445, 1998.

WANG, A.W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I. et al. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, n. 6, p. 921-925, 1997.

WU, T.W.; HASHIMOTO, N.; WU, J. et al. The cryoprotective effect of trolox demonstrated with three types of human cells. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 68, p. 1189,1990.

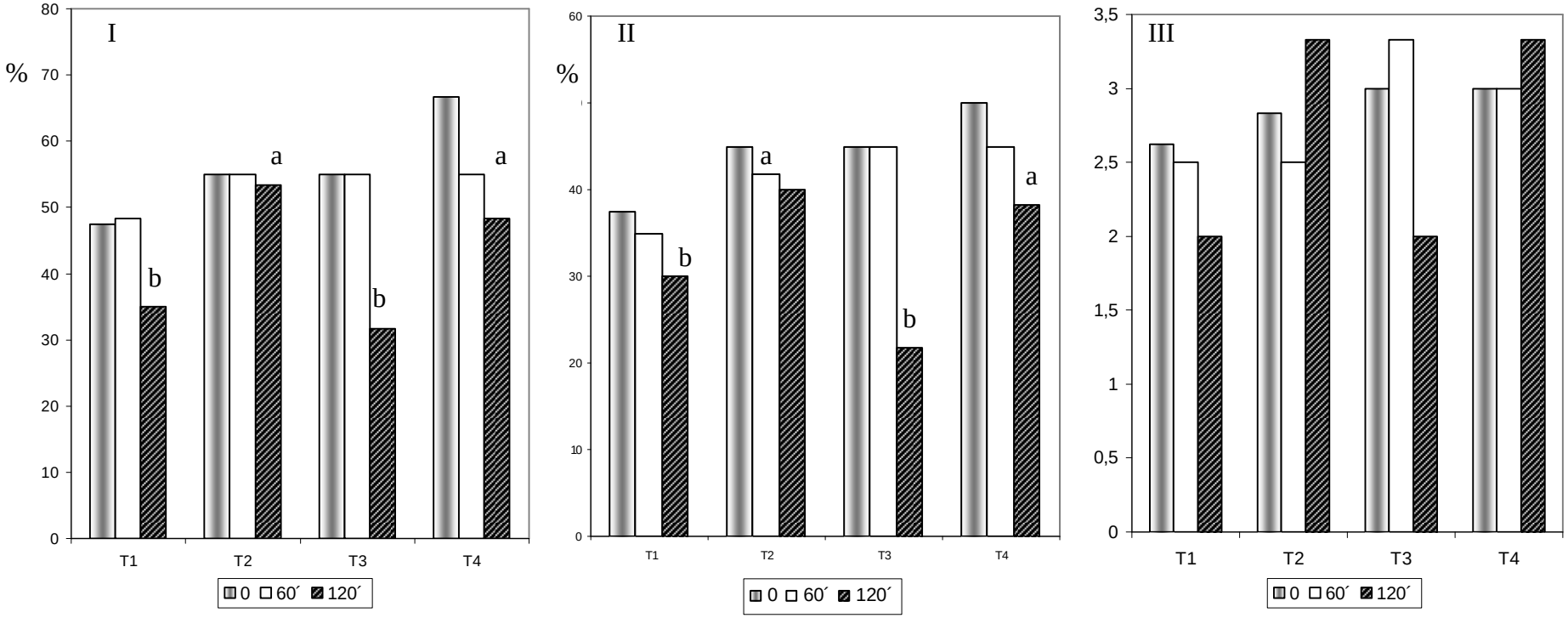

Figura 1 – Motilidade total (I), progressiva (II) e vigor (III) de espermatozóides eqüinos após descongelação e diluição em Tris (T1), acrescido de Trolox (T2), Pentoxifilina (T3) ou Trolox + Pentoxifilina (T4) após 0, 60 e 120 minutos de incubação a 37 ^{o}C. Letras distintas entre tratamentos P<0,05.

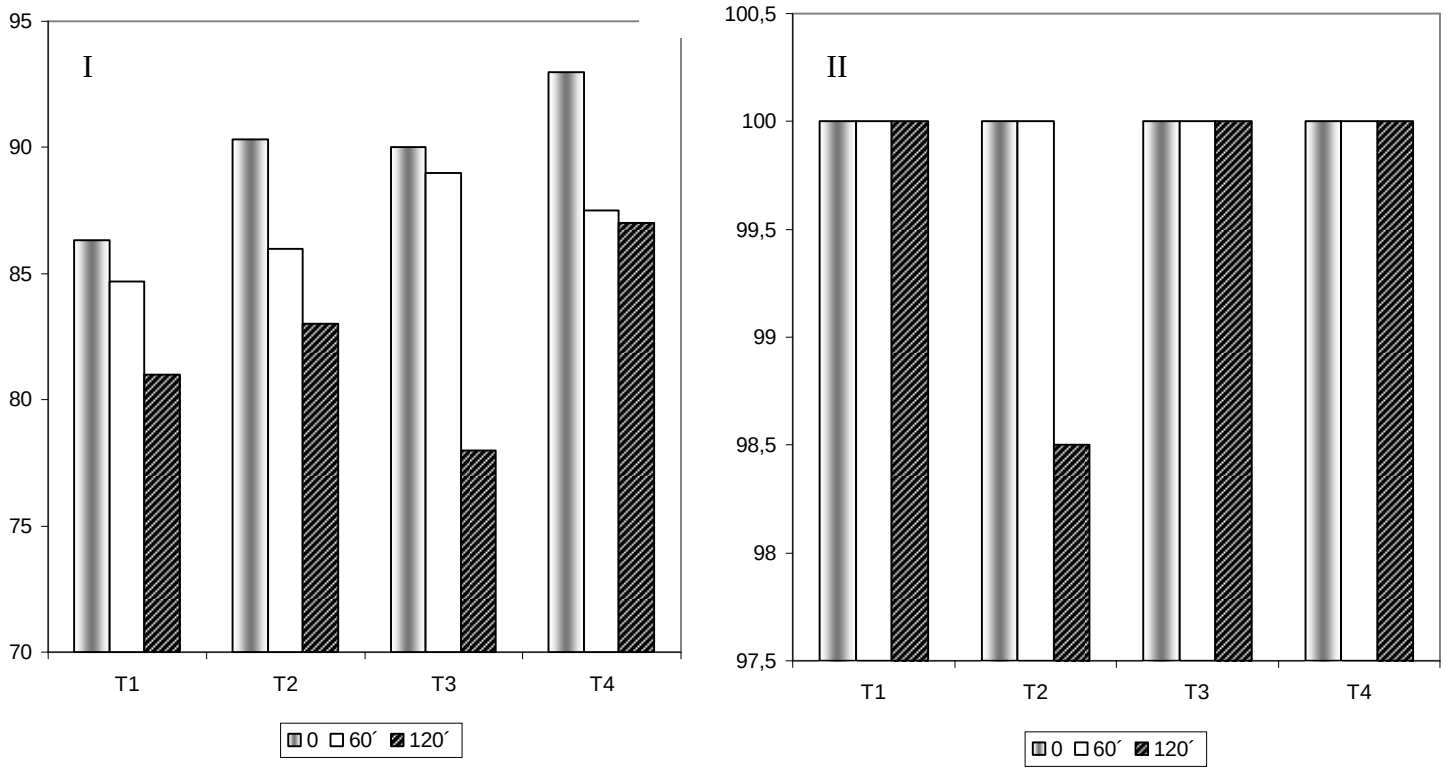

Figura 2 – Porcentual de espermatozóides eqüinos com acrossomas (I) e DNA (II) íntegros após descongelação e diluição em Tris (T1), acrescido de Trolox (T2), Pentoxifilina (T3) ou Trolox + Pentoxifilina (T4) após 0, 60 e 120 minutos de incubação a 37 ^{o}C.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foram estudadas as proteínas da membrana plasmática do sêmen *in natura*, em duas estações do ano, de reprodutores eqüinos criados na zona da Mata do Estado de Pernambuco – Brasil, onde se identificou proteínas com peso molecular entre 36 e 97 kDa na estação não reprodutiva (inverno), as quais poderão ser responsáveis pela baixa qualidade do sêmen eqüino. Todavia, considerando o número de animais utilizados, mais estudos devem ser realizados visando ampliar o conhecimento destas proteínas e, assim, possibilitar a seleção de reprodutores que apresentem melhor capacidade reprodutiva.

Foi também testada a utilização de 120µM/mL de Trolox e 2mM de Piruvato adicionado ao meio diluidor antes da congelação no período reprodutivo (primavera/verão) no hemisfério norte (Coimbra/Portugal), onde a utilização do Piruvato melhorou significativamente a motilidade espermática dos garanhões férteis e subférteis, porém, nenhum dos dois antioxidantes preservou os parâmetros seminais dos eqüinos submetidos à congelação/descongelação.

O terceiro experimento foi realizado para estudar a ação de 120µM/mL de Trolox e 3,5mM de Pentoxifilina adicionado ao sêmen descongelado colhido no período não reprodutivo (inverno) de animais criados na zona da Mata do Estado de Pernambuco – Brasil. A adição de Trolox ao diluente utilizado após a descongelação do sêmen preservou mais a motilidade total e progressiva das células espermáticas em relação ao outro antioxidante.

A utilização de antioxidantes parece agir de forma mais atuante quando administrada após a descongelação do sêmen e depois de um determinado tempo de ação. Verificou-se também que os animais com baixa qualidade seminal são os que apresentaram melhor resposta à ação dos antioxidantes. Outras pesquisas serão necessárias para que se possa conhecer melhor a ação dos antioxidante sob essas condições estudadas.

5. REFERÊNCIAS

AITKEN, R.J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioassay**, v. 16, p. 259-267, 1994.

ALMQUIST, J.O.; WIGGINS, H.B. Survival of bull spermatozoa frozen and thawed by different methods in plastic straws. **A. I. Digest.**, v. 21, n. 7, p. 12, 1973.

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

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 42, p. 334-346, 1995.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet. Sci.**, v. 7, p. 145-173, 1987.

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

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **J. Androl.**, v. 21, n. 6, p. 895-901, 2000.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, N.C.; SIRARD, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk tris extender: protection by piruvate, metal chelators and bovine liver or aviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, p. 105-1122, 2002.

BLANES, R.; FERNÁNDEZ, P.J.; JIMÉNEZ, A. et al. La pentoxifilina como agene antioxidante en el processo de criopreservación espermática. **Rev. Iberoamer. Fertil.**, v. 21, n. 4, 2004.

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A. et al. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **An. Reprod. Sci.**, v. 65, p. 75-88, 2001.

BOGAR, R.; MAYER, D.T. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoa viability. **J. Anim. Sci.**, v. 9, p. 143-152, 1950.

BOLLE, P.; EVANDRI, M.G.; SASO, L. The controversial efficacy of vitamine E for human male infertility. **Contraception**, v. 65, p. 313-315, 2002.

BRAVO, R.; CELIS, J.E. IN: CELIS, J.E. et al. **Two-Dimensional gel electrophoresis of proteins: Methods and Aplication,** Orlando: Academic Press, 1984, 445p.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. **The FASEB J.**, v. 13, p. 1145-1155, 1999.

BRUEMMER, J.E.; COY, R.C.; SQUIRES, E.L. et al. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. **J. Anim. Sci.**, v. 80, p. 12-18, 2002.

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

CLAY, C.M.; CLAY, J.N. Endocrine and testicular changes associated with season, artificial photoperiod and the peri-pubertal period in stallion. In: BLANCHARD, TL, VARNER, DD (Eds) Stallion management. **Vet. Clin. North Amer.,** v. 8, p. 31-56, 1992.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 49, p. 831-841, 1997.

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

De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **J. Reprod. Fertil.**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DELL'AQUA JÚNIOR, J.A.; PAPA, F.O. Efeito de diluentes e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelação de sêmen eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, n. 3, p. 460-462, 2001.

FABBROCINE, A.; Del SORBO, C.; FASANO, G.; SANSONE, G. Effect of diferencial adition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of mediterranean buffalo (B. bubbalis) spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 193- 207, 2000.

FONSECA, F.W.; MATTA, M.F.R.; CRUZ, G.M. et al. Análise das proteínas purificadas de membranas de espermatozóides de eqüino “in natura” e pós-descongelamento em géis de eletroforese. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 26, n. 3, p. 191-194, 2002.

FRENETTE, G. SULLIVAN, R. Prostasome like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. **Mol. Reprod Dev.** v.59, p.115-21, 2001.

FRENETTE, G. LESSARD, C. SULLIVAN, R. Selected protein of “prostasome-like particles”from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 308- 23, 2002.

FÜRST, R., CARVALHO, G.R., FÜRST, M.C.O. et al. Efeito do resfriamento na criopreservação do sêmen eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, n. 3, p. 348-350, 2003.

GARRELS, J.I. Two dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. **J. Biol. Chem.**, v. 25, p. 7961-77, 1979.

GASTAL, M.O.; HENRY, M.; BEKER, A. R. et al. Effect of ejaculation frequency and season on donkey Jack semen. **Theriogenology**, v. 47, p. 627-38, 1997.

GAVELLA, M.; LIPOVAC, V.; MARITTI, T. Effect of pentoxyfylline on superoxide anion production by human spermatozoa. **Int. J. Androl.**, v. 14, p. 320-327, 1991.

GAVELLA, M.; LIPOVAC, V. Pentoxyfylline-mediated reduction of superoxide anion production by human spermatozoa. **Andrologia**, v. 24, p. 37-39, 1992.

GERLACH, T.; AURICH, J.E. Regulation of season reproductive activity in the stallion, ram and hamster. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 58, p. 197-213, 2000.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (revisão de literatura). **Rev. Brasil. Reprod. Anim.,** v. 28, n. 4. p. 1-9. 2004.

GUERRA, M.M.P.; De GRAAF, S. et al. Efeito de vitaminas C e E na viabilidade de espermatozóides ovinos submetidos a diluição, coloração com Hoechst 33342 e congelação. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 15, Goiânia. **Anais…**Goiânia: 2005. p.16 (Resumo).

GOULART, H.M.; SILVA, A.E.D.F.; McMANUS, C. et al. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozóides de eqüinos, após o resfriamneto a 5 ^{0}C. **R. Bra. Zoot.**, v. 33, n.1, p.112-122, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radic. in Biol. and Med.** 3ed., New York: Oxford University Press: 1999, 936p.

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

HENRY, M.; SILVA, K.M.G.; SOUZA, M.C.N. et al. Seminal parameters of donkeys: influence of the season. **Rev. Bras. Reprod. Anim.,** v. 23, p. 237-240, 1999.

HENRY, M.; SOUZA, M.C.N.; SILVA, K.M.G. et al. Annual pericopulatory behaviour and breeding drive of jacks in a semi-confined managements system. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14, Stockholm, **Anais…**2000, p. 127.

HOLLEMAN, M.A.F. Notice sur l´action de l´eau oxygenee sur les acides α-cetoniques et sur les dicetones 1.2. **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas Belg.**, v. 23, p. 169-172, 1904.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, p. 4-22, 2000.

JANETT, F.; THUN, R.; BETTSCHEN, S. et al. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 77, p. 213-21, 2003.

JOHNSON, L. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. **Biol. Reprod.**, v. 44, p. 284-291, 1991.

JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R.J. Peroxidative breakdown of phospolipids in human spermatozoa: spermicidal of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. **Fertil. Steril.**, v. 31, p. 531-537, 1979.

KAGAN, V.E.; SERBINOVA, E.A.; FORTE, T. et al. Recycling of vitamin E in low density lipoproteins. **J. Lipid. Res**., v. 33, p. 385-397, 1992.

KAROW, A.M. Cryobiology for mammalian embryologists. Augusta, GROSgia, USA, 2001 (Xytex Corporation). Disponível em http://www.xytex.com./Cryobiology >. Acesso em: 10 outubro de 2004.

KASHINO, Y. Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. **J. Chromat. B**, v. 797, p. 191-216, 2003.

KAYA, A.; AKSOY, M.; BASPINAR, N. et al. Effect of melatonin implantation to sperm donor rams on post-thaw viability and acrosomal integrity of sperm cells in the breeding and non-breeding season. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 36, p. 211-215, 2001.

KENNEY, R.M.; BERMAN, R.V.; COOPER, W.L. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTIONERS, 21, 1975, Boston. **Proceedings ...**, Boston, 1975. p.327-36.

KUNDU, C.N.; CHAKIRABOLTY, J.; DUTTA, P. et al. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and the goat caudal epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40 p. 117-125, 2000.

LANDA, C.A.; ALMQUIST, J.O. Effect of freezing large numbers of straws of bovine spermatozoa in an automatic freezer on post-thaw motility and acrosomal retention. **J. Anim. Sci.,** v. 49, n. 5, p. 1190-1194, 1979.

LASLEY, J.F., MAYER, D.T. A variable physiological factors necessary for the survival of bull spermatozoa. **J. Anim. Sci.**, v. 3, p. 129-134, 1994.

LEME, D.P.; PAPA, F.O.; ROSER, J.F. et al. Sazonalidade reprodutiva de garanhões nos trópicos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**., v. 27, n. 2, p. 207-209, 2003.

MacLOAD, J.M.; PAUPARD, M.C.; ORR, A.G. Flagellar-associated cAMP-dependent protein kinases in mammalian sperm. In: BACCETTI, B. (ed.), **Compar. Spermatol. 20 years After**, vol.75, New York: Raven Press, p.397-401, 1991.

MAGISTRINI, M.; CHANTELOUBE, P.; PALMER, E. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. **J. Reprod. Fértil. Suppl.**, v. 35, p. 127-133, 1987.

MANETTA, L.A. **Efeito da pentoxifilina sobre a motilidade e concentração dos espermatozóides humanos de indivíduos inférteis portadores de oligozoospermia e astenozoospermia.** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 1997. 59 p. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade de São Paulo, 1997.

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

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and aplications. **Am. J. Physiol.**, Baltimore, v. 247, p. 125-142, 1984.

MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; FARRANT, J. et al. **Interactions of cooling rate, warning rate and protective additive in the survival of frozen mammalian cells.** In: WOLSTENHOLME, G.E.W., O'CONNOR, M. (Eds.). The frozen Cell. London:Churchill, p. 69-88, 1970.

MEYERS, S.A.; ROSENBERGER, A.E. A plasma membrane-associated hyaluronidase is localized to the posterior acrosomal region of stallion sperm and is associated with spermatozoal function. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 444-451, 1999.

NASSAR, A.; MAHONY, M.; BLACKMORE, P. et al. Increased of intracellular calcium is not a cause of pentoxifylline-induced hyperactivated motility or acrosome reaction in human sperm. **Fertil. Steril.**, v. 69, n. 4, p. 749-754, 1998.

NATH, K.A.; NGO, E.O.; HEBBEL, R.P.; CROATT, A.J. et al. α-Ketoacids scavenge H_2O_2 in vitro and in vivo and reduce menadione-induced DNA injury and cytotoxicity. **Am. J. Physiol.**, v. 268, p. 227-236, 1995.

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

O´FARREL, P.H. High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

O´FLAHERTY, C.O.; De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, p. 1045-1055, 2006.

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 26, n. 3, p. 184-187, 2002.

PAPA, F.O.; SANTOS, T.B.; MACEDO, L.P. et al. Influência da distância entre o nível do nitrogênio líquido e as palhetas de sêmen durante o processo de congelação sobre os parâmetros espermáticos de sêmen de eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, n. 3, p. 368-370, 2003.

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

PERRAULT, S.D.; ROGERS, B.J. Capacitation pattern of human spermatozoa. **Fertil. Steril.**, v. 38, p. 258-260, 1992.

PICKETT, B.W.; VOSS, J.L. Reproductive management of the stallion. **Proc. Am. Assoc. Equine Prac.,** v. 18, p. 501-531, 1972.

PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; SEIDEL Jr., G.E. et al. Reproductive physiology of stallion. 6. Seminal and behavioral characteristics. **J. Anim. Sci.,** v. 43, p. 617-625, 1976.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKERS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

RAJEEV, S.K.; REDDY, K.V.R. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile man: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. **Hum. Reprod.**, v. 19, n. 2, p. 234-242, 2004.

REITER, R.J.; GUERRERO, J.M.; GARCIA, J.J. et al. Reactive oxygen intermediates, molecular damage and aging. Relation to melatonin. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 20, p. 410-424, 1998.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C.; RODRIGUES, L.H. et al. Comparação do perfil protéico de membrana de espermatozóides do sêmen fresco, diluído e pós-congelação. **Rev. Bras. Reprod. Anim.,** v. 23, n. 3, p. 226-228, 1999.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E.S.C.; ESPER, C.R. et al. Fertility-associated proteins in Nelore Bull sperm membranes. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 91, p. 77-87, 2006.

SABERWALL, G.S.; SHARME, M.K.; BALASINOR, N. et al. Estrogen receptor, calcium mobilization and rat sperm motility. **Mol. and Cel. Bioch.**, v. 237, p. 11-20, 2002.

SALAMON, S.; LIGHTFOOT, R.J. Freezing of ram spermatozoa by the pellet method. 1. The effect of diluent composition on the survival of spermatozoa. **Aust. J. Biol. Sci.,** v. 22, p. 1527-1546, 1969.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II, causes of low fertility after cervical insemination methods of improvement. **Anim Reprod Sci**, v. 38, p. 1-36, 1995.

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

SATOH, K.; KADOFUKU, T.; SAKAGAMI, H. Effect of trolox, a synthetic analog of α-tocopherol, on cytotoxicity induced by UV irradiation and antioxidants. **Antic. Res.**, v. 17, p. 2459-2464, 1997.

SHARMA, R.K.; TOLENTINO, M.V.; AGARWAAL, A. Sperm kinematics of cryopreserved normozoospermic specimens after artificial stimulation. **Urology.**, v. 47, p. 77-81, 1996.

SHEN, M.; CHIANG, P.; YANG, R. et al. Pentoxifylline stimulates human sperm motility both in vitro and after oral therapy. **Br. J. Clin. Pharm.**, v. 31, p. 711-714, 1991.

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

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

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

SNOECK, P.P.N.; FERREIRA, M.K.V.; HENRY, M. Avaliação do efeito do transporte de sêmen eqüino no período pré-congelamento sobre a viabilidade espermática avaliada in vitro após o descongelamento. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, n. 3, p.346- 348, 2003.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K. et al. **Cooled and frozen stallion semen.** Fort Collins: Colorado State University, 1999. 90 p. (Animal Reproduction and Biotechnology, Laboratory, 9).

STACHECKI, J.J.; GINSBURG, K.A.; ARMANT D.R. Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline and 2´-deoxyadenisine. **J. Androl.**, v. 15, p. 157-164, 1994.

SULLIVAN, R. Male fertility markers, myth or reality. **Anim. Repr. Sci.**. v. 81-83, p. 341-7, 2004.

UPRETI, G.C.K.; JENSEN, R.; MUNDAY, D.M. et al. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 51, p. 275-287, 1998.

VIJAYARAGHAVAN, S.; STEPHENS, D.T.; TRAUTMAN, K. et al. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase Kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. **Biol. Reprod.**, v. 54, p. 709-718, 1996.

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

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60, n. 1, p. 481-492, 2000.

WILMUT, I.; POLGE, C. The low temperature preservation of boar spermatozoa: II. The motility and morphology of boar spermatozoa and thawed in diluent which contained only sugar and egg yolk. **Cryobiology**, v. 14, p. 479-482, 1977.

WOLF, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R. et al. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 1506-1514, 1998.

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

ZINI, A.; De LAMIRANDE, E.; GANON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa**. Int. J. Androl.**, v. 16, p. 183-188, 1993.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo