

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTE NO DILUIDOR PARA A
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO AVALIADO ATRAVÉS DE
TESTES COMPLEMENTARES, INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E
FECUNDAÇÃO *IN VITRO***

Juliana Corrêa Borges

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini
Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco

Defesa de tese apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, *Campus* de Jaboticabal, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (na área de Reprodução Animal)

JABOTICABAL – SP – BRASIL
Fevereiro -2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

B732e Borges, Juliana Corrêa
Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a
criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes
complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro* / Juliana
Corrêa Borges. – – Jaboticabal, 2008
xxii, 70 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

Orientador: Paulo Henrique Franceschini

Banca examinadora: Cesar Roberto Esper, Joaquim Mansano
Garcia, Sony Dimas Bicudo, José Domingos Guimarães

Bibliografia

1. Antioxidante. 2. Bovinos. 3. Reprodução Animal. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.613:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: julicborges@yahoo.com.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

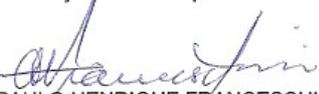
TÍTULO: EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTE NO DILUIDOR PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO AVALIADO ATRAVÉS DE TESTES COMPLEMENTARES, INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E FECUNDAÇÃO IN VITRO

AUTORA: JULIANA CORRÊA BORGES

ORIENTADOR: Dr. PAULO HENRIQUE FRANCESCHINI

Co-Orientador(a): DR. ANTÔNIO CLÁUDIO TEDESCO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Dr. PAULO HENRIQUE FRANCESCHINI

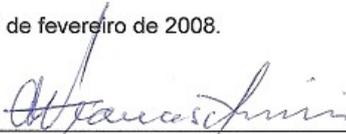

Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA


Dr. CESAR ROBERTO ESPER


Dr. SONY DIMAS BICUDO


Dr. JOSÉ DOMINGOS GUIMARÃES

Data da realização: 27 de fevereiro de 2008.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. PAULO HENRIQUE FRANCESCHINI

AGRADEÇO E DEDICO...

À DEUS

Por tudo que tenho... pela minha vida!!!

“Basta-me um pequeno gesto feito de longe e de leve, para que venhas comigo e eu para sempre te leve...”

(Cecília Meireles)

“Lembra-te sempre: cada dia nasce de novo amanhecer.”

(Chico Xavier)

AOS MEUS PAIS,

Irineu Oliveira Borges e

Eiza Maria Corrêa Borges,

Pelos ensinamentos (além desta vida), dedicação, confiança e incentivo.

E principalmente pelo amor eterno e incondicional.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

(Fernando Pessoa)

“Minha maior e mais valiosa herança é a educação que vocês me deram.”

(Juliana Corrêa Borges)

AO AMIGO, AMADO E MARIDO MÁRCIO,

Pela amizade, amor, compreensão, paciência, companheirismo e pelos votos de seguirmos o mesmo horizonte e sermos um a vida do outro.

"O amor faz com que tudo, de repente, pareça possível."

(H. Jackson Brown)

AS MINHAS IRMÃS E FAMILIARES,

Pelo amor, amizade, admiração e torcida.

“Acima de tudo seja bom. A bondade, mas do que qualquer outra coisa desarma os homens.”

(Lacordaire)

AOS MEUS FILHOTES DUCK, BONI E BEN

Pela demonstração de amor, carinho e felicidade todos os dias.

“Sonhe como se fosse viver para sempre, viva como se fosse morrer amanhã.”

(James Dean)

Se em horas de encontro pode haver tantos desencontros, que a hora da separação seja, tão somente, a hora de um verdadeiro, profundo e coletivo encontro.

De tudo ficarão três coisas: a certeza de estar sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de ser interrompido antes de terminar. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.

(Fernando Sabino)

Durante o mestrado três frases serviram de referência para eu superar as dificuldades científicas e pessoais. Agora no doutorado, mais experiente, incluo uma frase e reformulo outra. Tomará que elas possam ajudar a você a acreditar, crescer e vencer os obstáculos como me ajudaram e me ajudarão sempre:

- 1) **TEMPO É QUESTÃO DE PRIORIDADE**
- 2) **EXPERIÊNCIA NADA MAIS É DO QUE REPETIÇÃO**
- 3) **NO FINAL TUDO DÁ CERTO**
- 4) **EU LEVO A MINHA VIDA E NÃO DEIXO A VIDA ME LEVAR.**

META,
A GENTE BUSCA.
CAMINHO,
A GENTE ACHA.
DESAFIO,
A GENTE ENFRENTA.
DESEJO,
A GENTE MATA.
VIDA,
A GENTE INVENTA.
E O SONHO...
A GENTE REALIZA.
(autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista, em especial ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal pela oportunidade.

À FAPESP, pela concessão de bolsa de estudo durante o período do doutorado, possibilitando a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini (Cocão), pela confiança, incentivo, ensinamentos e principalmente pelas valiosas orientações profissionais e pessoais, sem contar a empatia recíproca e a grande amizade. Com certeza, das nossas conversas surgirão trabalhos tão valiosos quanto esta tese. “Se 12 semanas já mudam uma vida, imagine 208 semanas...”

Ao Prof. Dr. Cesar Roberto Esper por acreditar em nosso trabalho e viabilizá-lo. E principalmente por seus ensinamentos, orientações e amizade, sempre querendo o melhor para mim.

Aos professores e amigos Dr. Joaquim Mansano Garcia, Dr. Francisco Guilherme Leite, Dra. Gisele Zocal Mingoti por participarem desta equipe com sugestões e estarem dispostos a clarear minhas dúvidas quando procurados e pelos seus conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo pela disponibilidade em participar da defesa e sugestões.

Ao Prof. Antônio Cláudio Tedesco pela simpatia e paciência e por participar desta equipe e aceitar novos desafios na área da reprodução animal e na adoção de uma orientada na área de radicais livres me auxiliando na busca de um protocolo inovador.

À central de inseminação artificial, Lagoa da Serra e todos os funcionários, por dar condições para realização deste experimento, em especial ao Guus Laeven, diretor-presidente da empresa, e à Lúcia Helena Rodrigues, gerente geral de produção, fundamental para a realização deste trabalho. Aos funcionários Carlinhos, Luana, Mauro e Gil pela hospitalidade e colaboração.

À Empresa Agropecuária Muguidjana, onde foi realizada a parte experimental das inseminações artificiais, em especial ao Daniel Pagotto (diretor), Alcir Menezes (gerente administrativo) e todos os inseminadores.

Ao amigo Prof. Dr. José Domingos Guimarães pela confiança, orientação, indicação de um caminho e disponibilidade em participar da defesa.

Ao José Antônio Fernandes Júnior (Cabeça) um amigo que apesar da pouca convivência enxerga nas pessoas um objetivo e as ajuda mesmo sem saber.

À Profa. Dra. Lúcia Galvão de Albuquerque pela amizade e empatia desde o primeiro momento e principalmente por ser responsável pela união de um casal.

Aos demais professores do DRA, Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo e Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima pela amizade, convívio e conhecimentos transmitidos.

À Isabel, Roberta, Ivo e Paulo amigos e funcionários do DRA, que sempre nos ajudaram, principalmente na hora do aperto.

Ao Prof. Dr. Hélio Vannucchi, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por disponibilizar de imediato, ajuda quando necessário. À Mônica, técnica do seu laboratório pela atenção.

À Érika da Silva Carvalho Morani por me ajudar prontamente quando precisei.

À Marciane da Silva Maia, pela troca de experiência, palavras de incentivo e amizade.

Ao Gilson e Renato por coletarem o material de trabalho necessário aos experimentos na parte relacionada à fecundação *in vitro*.

À Leticia Siqueira de Sá Barretto por me ensinar o protocolo e a Patrícia Marafon Porciuncula por me auxiliar na interpretação das leituras das lâminas de TUNEL.

Ao Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros por me auxiliar na análise estatística dos trabalhos. E ao Prof. Dr. Julio Balieiro por também me ajudar quando necessário.

Ao casal Simone Méo Niciura e Cristiano Niciura pela valiosa amizade, incentivo, torcida e companheirismo.

Aos amigos Alexandre Wolf, Andréia Cristina Basso, Carlos Eurico Fernandes, Cléber Barbosa Oliveira, Christina Ramires Ferreria, Edson, Eric Caiado Castro, Ériklis Nogueira, Erlon Júnior, Felipe Perecin, Júnior, Letícia Barretto, Marcelo Roncoleta, Lorivaldo Paz Landim Jr., Rúbia Bueno da Silva, Sandra, Viviane Sgobbi Dias e Walt Yamazaki que fizeram falta no convívio por terem terminado suas obrigações aqui e terem continuado suas jornadas, mas que serão sempre lembrados por todos os momentos compartilhados e, sobretudo porque amizade resiste a qualquer distância.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Animal, Ana Paula Perini, Aline Costa Lúcio, Clara Slade, Danilas Salinet de Melo, Eliana Cristina Gazoto, Fábio Moretto, Fernanda da Silva Gonçalves, Fernanda Patrícia Gottardi, Juliana de Souza Pinto Pieroni, Kellen de Sousa Oliveira, Letícia Zoccolaro Oliveira, Mabel Freitas Cordeiro, Marcelo Barbosa Bezerra, Maria Emília Franco Oliveira, Max Vitória Resende (e Adriana), Michelly Fernandes de Macedo, Naiara Zoccal Saraiva, Tatiane Drummond Tetzner e Valeska Rodrigues, por terem caminhado comigo nos bons e maus momentos, compartilhando muito além do que um aprendizado acadêmico, e aos demais colegas de pós-graduação pelo agradável convívio durante estes anos, em especial a Aracelle, Eliandra, Eveline, João, Maricy, Robertinha e Tati (UV).

À Sabryna Gouveia Calazans, Sabrina Marin Rodigheri, Simone Crestoni Fernandes, Ricardo Souza Vasconcelos e Fernanda Gottardi, anjos da guarda, pela valiosa amizade e por cuidarem dos meus cachorros quando eu tinha que viajar.

A todos estagiários do Laboratório de Reprodução, em especial, ao Rodrigo (Tonel), Welton e Tássia, pelo convívio, auxílio e participação na fase laboratorial.

As amigas-irmãs, Vanessa Mollica Caetano, Aline Quadros Santos Bonilla, Marilú Martins Gioso e Cristiane Torres Barbosa que mesmo na ausência sempre se fazem presente.

Aos amigos queridos de São Paulo, de Viçosa, de Corumbá e de Jaboticabal que aqui não foram citados por falta de espaço e não de lembranças.

E a todas as pessoas que comigo conviveram e de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho.

...MUITO OBRIGADA.

BIOGRAFIA

JULIANA CORRÊA BORGES, filha de Irineu Oliveira Borges e Eiza Maria Corrêa Borges, nasceu na cidade de São Paulo, São Paulo, em 27 de julho de 1976; concluiu o ensino médio no Colégio Emilie de Villeneuve de 1º e 2º Graus, na cidade de São Paulo – SP, em dezembro de 1993. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – UFV - Minas Gerais, em março de 1996. Concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em março de 2001. Ingressou no curso de pós-graduação, ao nível de Mestrado, sob orientação do Prof. Dr. José Domingos Guimarães, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na mesma Universidade, em abril de 2001, com bolsa de mestrado da Capes, e concluiu, em abril de 2003, com a defesa da Dissertação “Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino”. De julho de 2003 a fevereiro de 2004 lecionou disciplinas de Anatomia e Reprodução Animal, na Universidade Católica Don Bosco, em Corumbá – MS. Ingressou no curso de pós-graduação, ao nível de Doutorado, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *Campus* de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em março de 2004, com bolsa de doutorado da FAPESP (processo nº 05/54801-8).

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
1. Estrutura dos espermatozóides e da membrana plasmática.....	1
2. Capacitação espermática e reação acrossômica	2
3. Radicais livres e antioxidantes.....	3
4. Diluidores e criopreservação espermática.....	6
5. Testes complementares.....	9
5.1. Características físicas e morfológicas do sêmen	9
5.2. Teste de termo-resistência	10
5.3. Teste hiposmótico.....	11
5.4. Teste de integridade da membrana plasmática (fluorescência).....	11
5.5. Teste de atividade citoquímica (DAB).....	12
5.6. Teste de TUNEL.....	13
6. Produção <i>in vitro</i> de embriões e inseminação artificial.....	13
7. Método de separação espermática.....	14
HIPÓTESES.....	15
OBJETIVOS.....	15
 CAPÍTULO 2 – UTILIZAÇÃO DE TESTES COMPLEMENTARES E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO COM DILUIDOR CONTENDO ANTIOXIDANTE	 16
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17

INTRODUÇÃO.....	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
Coleta de sêmen.....	19
Aspectos físicos e morfológico do sêmen.....	19
Meios diluidores de criopreservação.....	20
Preparação das soluções estoques.....	21
Diluição final.....	21
Resfriamento, congelação e descongelação.....	21
Experimento 1 - Testes complementares.....	22
Teste de termo-resistência lento modificado.....	22
Teste hiposmótico.....	23
Teste de integridade da membrana plasmática (fluorescência).....	23
Teste de atividade citoquímica (DAB).....	24
Experimento 2 – Inseminação artificial.....	25
Análise estatística.....	26
RESULTADOS.....	26
Características físicas e morfológicas do sêmen <i>in natura</i>	26
Experimento 1: Testes Complementares.....	28
Teste hiposmótico e fluorescência para sêmen diluído e congelado/descongelado.....	28
Teste de termo-resistência lento em sêmen pós-congelação.....	30
Teste de atividade citoplasmática (coloração DAB).....	31
Experimento 2: Testes <i>in vivo</i>	32
Inseminação Artificial.....	32
DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÕES.....	37
CAPÍTULO 3 – EFEITO DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO COM ANTIOXIDANTE SOBRE OS MÉTODOS DE SELEÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES (LAVAGEM X PERCOLL) NAS TAXAS DE CLIVAGEM, BLASTOCISTO E APOPTOSE DE EMBRIÕES PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i>	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
INTRODUÇÃO.....	40

MATERIAL E MÉTODOS.....	41
Criopreservação do sêmen.....	41
Coleta de oócitos e maturação <i>in vitro</i>	41
Experimento 1.....	41
Fecundação <i>in vitro</i>	42
Cultivo <i>in vitro</i>	42
Experimento 2 – Teste de TUNEL.....	42
Coloração “ Terminal transferase Assay” – TUNEL.....	42
Análise estatística.....	44
RESULTADOS.....	45
Comparação das técnicas de preparação espermática: gradiente de densidade descontínuo de Percoll e método de lavagem por simples centrifugação.....	45
Comparação do diluidor de criopreservação espermática: com e sem antioxidante.....	45
Comparação entre tratamentos: gradiente de densidade descontínuo de Percoll e método de lavagem por simples centrifugação de sêmen criopreservado com e sem antioxidante no diluidor.....	46
Fragmentação de DNA em embriões cultivados por 7 dias: teste de TUNEL.....	47
Fator touro.....	48
DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÕES.....	52
IMPLICAÇÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXO.....	67
Tabela 1A. Preparo da solução de fructose a 100 mOsm/Kg, empregado no teste hiposmótico..	67
Tabela 2A. Solução estoque e de trabalho empregadas na técnica de fluorescência para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides bovinos.....	67
Figura 1A: Fluxograma dos processos de congelamento, descongelamento e avaliação do sêmen bovino após descongelamento e utilização na inseminação artificial e fecundação <i>in vitro</i>	68
Tabela 3A: Coeficientes de correlação (r) entre as variáveis indicadoras da qualidade espermática pré e pós-descongelamento, de touros Nelore mantidos em regime de coleta em central de inseminação.....	69
Tabela 4A: Coeficientes de correlação (r) entre as variáveis indicadoras da qualidade espermática do sêmen dos touros da raça Nelore utilizados na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	70

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2 – UTILIZAÇÃO DE TESTES COMPLEMENTARES E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO COM DILUIDOR CONTENDO ANTIOXIDANTE16

Tabela 1: Características físicas e volume adicionado de diluidor e Trolox no sêmen *in natura* de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.....27

Tabela 2: Características morfológicas do sêmen *in natura* de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.....28

Tabela 3: Percentual médio \pm desvio padrão dos parâmetros espermáticos relativos à integridade das membranas plasmáticas, avaliados pelos testes hiposmótico e de fluorescência no sêmen de touros da raça Nelore, diluído e não congelado no Dil C e Dil T, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.....28

Tabela 4: Percentual médio \pm desvio padrão dos parâmetros espermáticos relativos à integridade das membranas plasmáticas, avaliados pelos testes hiposmótico e de fluorescência no sêmen de touros da raça Nelore, pré e pós congelamento com Dil C e Dil T, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.....29

Tabela 5: Percentual médio dos parâmetros espermáticos relativos à integridade das membranas plasmáticas, avaliados pelos testes hiposmótico e de fluorescência no sêmen de touros da raça Nelore, pós congelamento com Dil C e Dil T, e contrastados quanto a qualidade espermática, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.....30

Tabela 6: Percentual médio \pm desvio padrão da motilidade espermática progressiva retilínea no teste de termo-resistência lento (TTR) do sêmen de touros da raça Nelore, pós descongelamento com Dil C e Dil T, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.....30

Tabela 7: Percentual médio \pm desvio padrão do vigor espermático (0-5) no teste de termo-resistência lento (TTR) do sêmen de touros da raça Nelore, pós descongelamento com Dil C e Dil T, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.....31

Tabela 8: Percentual médio \pm desvio padrão da atividade citoquímica das mitocôndrias, observadas pelo teste de coloração DAB, em sêmen de touros da raça Nelore, pós-descongelamento com Dil C e Dil T, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.....32

Tabela 9: Número de prenhez, taxa de prenhez número total de inseminações para Dil C e Dil T, por touro utilizado.....33

CAPÍTULO 3 – EFEITO DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO COM ANTIOXIDANTE SOBRE OS MÉTODOS DE SELEÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES (LAVAGEM X PERCOLL) NAS TAXAS DE CLIVAGEM, BLASTOCISTO E APOPTOSE DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*38

Tabela 1: Percentual de clivagem, blastocisto e apoptose e número de células (blastômeros) para cada tratamento (gradiente descontínuo de Percoll + diluidor controle, gradiente descontínuo de Percoll + diluidor antioxidante, simples lavagem por centrifugação + diluidor controle e simples lavagem por centrifugação + diluidor antioxidante).....47

Tabela 2: Número total de células (blastômeros) por blastocisto e porcentagem de fragmentação do DNA com a utilização de sêmen de 5 touros Nelore.....48

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
Fig.1 – Representação da membrana plasmática (uma camada lipídica) destacando a região hidrofóbica e hidrofílica dos fosfolípideos.....	5
CAPÍTULO 2 – UTILIZAÇÃO DE TESTES COMPLEMENTARES E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO COM DILUIDOR CONTENDO ANTIOXIDANTE	16
Fig 1 – Seta indicando célula reativa ao teste hiposmótico, ou seja, com membrana plasmática íntegra.....	23
Fig 2 – Célula espermática vermelha, com membrana plasmática lesada e célula espermática verde com membrana plasmática íntegra, pelo teste de fluorescência.....	24
Fig.3. Valores médios da motilidade espermática progressiva retilínea no sêmen <i>in natura</i> coletado de cinco touros Nelore, mantidos em regime de coletas em Central de Inseminação.....	27
Fig.4. Valores médios obtidos nos teste hiposmótico e de fluorescência para células com membrana plasmática íntegra, em sêmen de touros Nelore, pré e pós congelação com Dil C e Dil T, mantidos em regime de coletas em Central de Inseminação.....	29
Fig.5. Valores médios da motilidade espermática progressiva retilínea, obtidos pelo TTR lento, no sêmen pós-congelação de cinco touros Nelore, mantidos em regime de coletas em Central de Inseminação; destacando os touros 2, 4 e 5 como os melhores.....	31
Fig.6. Valores médios da atividade citoquímica das mitocôndrias, observadas pelo teste de coloração DAB, em sêmen de touros da raça Nelore, pós-descongelação com Dil C e Dil T, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.....	32
Fig.7. Porcentagem de novilhas gestantes em relação ao Dil C e Dil T para touros da raça Nelore....	33

CAPÍTULO 3 – EFEITO DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO COM ANTIOXIDANTE SOBRE OS MÉTODOS DE SELEÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES (LAVAGEM X PERCOLL) NAS TAXAS DE CLIVAGEM, BLASTOCISTO E APOPTOSE DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*38

Fig 1 – Blastocistos no dia 7, corados pela técnica de coloração TUNEL, observados em microcópico de epifluorescência. A) Blastômeros corados pelo Hoechst 33342; B) Setas indicam células com fragmentação do DNA, com núcleo picnótico.....44

Fig. 2. Taxa de desenvolvimento embrionário (clivagem e produção de blastocisto) pelos diferentes métodos de separação espermática (método da simple lavagem por centrifugação e gradiente descontínuo de Percoll) utilizado no sêmen de touros Nelore.....45

Fig. 3. Taxa de desenvolvimento embrionário (clivagem e produção de blastocisto) por diluidores (com e sem antioxidante) utilizado no sêmen de touros Nelore.46

Fig.4. Valores médios ajustados da motilidade espermática progressiva retilínea, obtidos após diferentes métodos de separação do sêmen (método de lavagem x gradiente de Percoll) e com diferentes diluidores (Diluidor controle x Diluidor Trolox).....47

Fig. 5. Porcentagem de patologia espermática (defeito maior, menor e total) dos cinco touros Nelore utilizados na fecundação *in vitro*, para produção de embriões.....48

Fig. 6. Taxa de desenvolvimento embrionário (clivagem e produção de blastocisto) considerando sêmen dos cinco touros Nelore avaliados.....49

Fig.7. Porcentagem de células apoptóticas dos embriões produzidos com a utilização do sêmen de diferentes touros.....49

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – análise de variância
ATP – trifosfato de adenosina
Bl – blastocisto
Bl D7 – blastocisto dia 7
Bl D9 – blastocisto dia 9
BSA – albumina sérica bovina
°C – graus Celsius
CIV – cultivo *in vitro*
CLIV - clivagem
CO₂ – dióxido de carbono
COC – complexo *cumulus* – oócito
DAB – diaminobenzidina
Dil C – diluidor controle
Dil T – diluidor Trolox
Dil C ML - diluidor controle método de lavagem
Dil C GP - diluidor controle gradiente descontínuo de Percoll
Dil T ML - diluidor Trolox método de lavagem
Dil T GP - diluidor Trolox gradiente descontínuo de Percoll
DMA – defeitos maiores
DME – defeitos menores
DNA – ácido desoxirribonucléico
DT – defeitos totais
EDTA – etilenodiaminotetraacético
EP – erro Padrão
FIV – fecundação *in vitro*
FLUO – teste de fluorescência
FSH – hormônio folículo estimulante
GP – gradiente descontínuo de Percoll
GSH – glutathione
hCG – gonadotrofina coriônica humana
H₂O₂ – peróxido de Hidrogênio
hpi – horas pós-inseminação
HIPO – teste hiposmótico
HPO – horseradish peroxidase
IA – inseminação artificial
IAC – índice de atividade citoquímica
KCN – cianeto de potássio
LH- hormônio luteinizante
LIPO – lipoperoxidação
MA – mitocôndria ativa
MAP – proteína ativadora por mitógeno
MAPK - proteína ativadora por mitógeno cinase
MCI – massa celular interna
MI- mitocôndria inativa
MIV – maturação *in vitro*

ML – método de lavagem
MMA – mitocôndria muito ativa
MOT – motilidade
MPA – mitocôndria pouco ativa
mg – miligrama
mM - milimol
mL – mililitro
n – número
N₂ - nitrogênio
NBT – nitro blue tetrazolium
nm – nanômetro
N oócitos – número de oócitos
OH• - Radical Hidroxila
O₂ – oxigênio
O₂⁻ - Ânion Superóxido
PBS – solução salina em tampão fosfato
PHE – penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIV – produção *in vitro*
pMol – picomol
PVP – polivinil pirrolidona
RL – radical livre
RNA – ácido ribonucléico
ROS – espécies reativas ao oxigênio
SAS – “statistical analysis system”
Seg - segundos
SFB - soro fetal bovino
SOD – superóxido dismutase
SOF – fluid ovidut sintetic
T – temperatura
TAPOP – taxa de apoptose
TALP – “Tyrode’s Albumin Lactate and Pyruvate”
TCM 199 – “Tissue culture médium 199”
TF – trofoblasto
TN – touros normais
TP – touros com patologia morfológica seminal
TUNEL – “In situ terminal deoxinucleotidyl transferase mediates dUTP nick end labeling assay”
TURB – turbilhamento
TTR – teste de termo resistência
UI – unidade internacional
VIG – vigor
VOL - volume
µL – microlitro
µM – micromol
% - porcentagem

EFEITO DA UTILIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTE NO DILUIDOR PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO AVALIADO ATRAVÉS DE TESTES COMPLEMENTARES, INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E FECUNDAÇÃO *IN VITRO*.

RESUMO - Efeitos deletérios dos radicais livres causam a lipoperoxidação da membrana plasmática dos gametas feminino e masculino e dos embriões cultivados *in vitro*, sendo responsável por perda da produção *in vitro* de embriões e redução da fertilidade *in vivo*. O estudo foi realizado com objetivo de investigar o efeito protetor do diluidor de sêmen contendo antioxidante submetido à criopreservação e avaliado por testes complementares (teste de termo resistência, hiposmótico e fluorescência), pela inseminação artificial e fertilização *in vitro*. Ejaculados de cinco touros foram agrupados nos seguintes tratamentos: 1 – Diluidor Tris – gema (controle – Dil C); 2 – Diluidor Tris –gema + Trolox 200 μ M (antioxidante-Dil T). Amostras com os diluidores com concentração final de 25 x 10⁶ espermatozoides/palheta foram envasadas em palhetas de 0,25 mL. Em uma fazenda localizada no Mato Grosso do Sul – MS, foram inseminadas 300 novilhas Nelore, e para cada touro realizou-se 60 inseminações artificiais (palhetas descongeladas em 35°C por 20 seg). Oócitos com citoplasma homogêneo e cumulus compacto de ovário de vacas de abatedouro foram selecionados e maturados em grupos de 25 por gota em 100 μ l de meio TCM 199 com SFB, FSH, hCG e estradiol, piruvato de sódio e amicacina, por 24 horas, sob óleo mineral, e foram cultivados com 5% CO₂ e 95% umidade em ar, a 38,5°C. Depois da maturação, os oócitos foram colocados em gotas com TALP contendo BSA, PHE e 10 μ g/ml de heparina com 1x 10⁶ espermatozoides móveis por ml. Quatro palhetas (duas – DC e duas – DT) do mesmo touro e ejaculado foram descongeladas e cada palheta foi processada por um método de separação espermática para recuperação do sobrenadante: método de lavagem (duas centrifugações de 36xg por 5 min em 2ml de TL-sêmen) e gradiente de Percoll (45 e 90%, submetido a centrifugação a 500xg por 30 min). Depois de 22 - 24 horas, os zigotos tinham as células do *cumulus* removidas e cultivadas em gotas de meio SOF suplementado com 2,5% SFB e 0,5% BSA, com 5% CO₂ e 95% umidade em ar, a 38,5°C, durante 9 dias. No dia 7 os embriões produzidos foram submetidos ao teste de TUNEL para detectar fragmentação de DNA. Os resultados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado, em tabela de contingência, com nível de significância de 5% para IA e PIV e pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% para as características dos testes complementares e o teste de

TUNEL. A avaliação da integridade funcional e estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides pelos testes complementares não diferiu ($p>0,05$) entre os diluidores. A taxa de prenhez diferiu entre touros ($p<0.001$) e touros com mais espermatozoides anormais foram melhor com antioxidante no diluidor ($p<0.06$). Diferenças nas taxas de blastocistos foram verificadas ($p<0.05$), 31.74% vs. 34,5%, para Dil C e Dil T, respectivamente. A produção de embriões foi melhor com o gradiente de Percoll do que com o método de lavagem (34,8% vs. 31.55%, respectivamente, $p<0.05$). A menor porcentagem de células apoptóticas foi para o método de lavagem com a utilização do Dil T ($p<0,05$) e observou-se diferença entre touros na produção de apoptose dos seus embriões ($p<0,05$). O uso de antioxidante no diluidor de sêmen melhorou a viabilidade espermática aumentando as taxas de blastocisto e de prenhez. A técnica de separação espermática, pelo gradiente de Percoll, aumentou a produção de blastocistos e foi melhor com a utilização do Dil T e os testes complementares não apresentaram diferença entre os tratamentos.

Palavras-Chave: Antioxidante, Blastocistos, Diluidores, Integridade de membrana, Produção de embriões, Sêmen, Taxa de prenhez, Touro

EFFECT OF ANTIOXIDANT IN THE CRYOPRESERVED BOVINE SEMEN EVALUATED BY COMPLEMENTARY TESTS, ARTIFICIAL INSEMINATION AND *IN VITRO* FERTILIZATION

ABSTRACT - Deleterious effects of free radicals cause lipoperoxidation of the plasmatic membrane of female and male gametes and *in vitro* cultured embryos, being responsible for losses in *in vitro* production of embryos and reduction in *in vivo* fertility. The objective of this study was to investigate the protective effects of semen extender containing antioxidant submitted to cryopreservation and evaluated by artificial insemination, *in vitro* fertilization and complementary tests (hyposmotic, fluorescence, and thermal resistance tests). Ejaculates from 5 bulls were treated with Tris egg yolk extender (control-CE) alone or supplemented with 200µl Trolox in the extender (antioxidant-AE). The samples with the extenders with a final concentration of 25×10^6 spermatozoa/ml were placed into 0.25 ml straws. Three hundred Nelore heifers from a cattle farm in Mato Grosso do Sul - MS, were separated into 5 groups of 60 animals. For artificial insemination, the straws were thawed at 35°C for 20 sec and the females in each group were inseminated with semen of the same bull, using 30 female for each semen extender treatment. For *in vitro* fertilization, oocytes with homogeneous cytoplasm and compact cumulus, collected from ovaries of slaughtered cows were selected and matured in groups of 25 in droplets of 100µl TCM 199 medium with FCS, FSH, hCG and estradiol, sodium pyruvate and ampicillin, for 24 hours, under mineral oil, in atmosphere of 5% CO₂ and 95% humidity in air, at 38.5°C. After maturation, the oocytes were placed in droplets with TALP containing BSA, PHE and 10µg/ml of heparin with 1×10^6 motile spermatozoa/ml. Four straws (two – CE and two – AE) from same bull and ejaculate were thawed and each straw was processed for one spermatozoa separation method for pellet recover: washing medium (twice centrifugations at 36g for 5 min in 2ml of TL-semen) and Percoll gradient (45 and 90%, submitted a centrifugation at 500g for 30 min). After 22 - 24 hours, zygotes were stripped from cumulus cells and cultivated in droplets of SOF medium supplemented with 2.5% FCS and 0.5% BSA in 5% CO₂ and 95% humidity in air, at 38.5°C, for 9 days. In the day 7, the embryos were submitted to TUNEL test for analysis of DNA fragmentation. The results were analyzed by Qui-square Test, in contingency table, with significance level of 5% for AI and PIV and by Tukey test, with significance level 5% for the characteristics of the complementary and TUNEL tests. The pregnancy rates differed between bulls ($p < 0.001$) and bulls with more abnormal spermatozoa were

better with antioxidant in the extender ($p < 0.06$). in the blastocysts rates were different ($p < 0.05$) for CE (31.74%) and AE (34,5%). Embryos development was higher ($p < 0.05$) after in vitro fertilization using Percoll gradient (34,8%) than compared to washing medium (31.55%). The utilization of the wash method with AE showed lower percentage apoptotic cells ($p < 0.05$) and showed difference among bulls, in the embryos apoptosis production ($p < 0.05$). Antioxidant in the semen extender improved spermatic viability and increased blastocyst in vitro development and pregnancy rates. The use of Percoll gradient, for sperm separate, increased blastocyst production and was better with AE than CE. The complementary tests showe no difference between treatments.

Key-Words: Antioxidant, Blastocysts, Bull, Embryo production, Extenders, Integrity membrane, Pregnancy rate, Semen

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Introdução

Estrutura do espermatozóide e da membrana plasmática

Quando se trata da estocagem dos espermatozóides para uso em qualquer biotecnologia aplicada à reprodução, é mais relevante considerá-los como constituídos de núcleos e microtúbulos altamente condensados, fibras e estruturas membranosas, devido à resposta diferenciada destes componentes estruturais ao choque térmico, redução de temperatura ou criopreservação (MAGNAGO, 2000). Os microtúbulos e as estruturas fibrosas são importantes para a motilidade espermática porque constituem os pares do axonema, das fibras densas e do revestimento fibroso das peças intermediária e terminal. Por outro lado, as estruturas membranosas são mais importantes sob a perspectiva do choque térmico (AMANN e GRAHAN, 1993; WATSON, 1995) e do estresse oxidativo (O'FLAHERTY et al., 1997 e 1999).

A membrana plasmática envolve todo o espermatozóide e é o componente mais externo. Embora seja contínua sobre a superfície dos espermatozóides, a sua natureza difere regionalmente (FLESH e GADELLA, 2000). A composição de proteínas das membranas de regiões diferentes varia mais do que a composição de lipídios, refletindo a especialização funcional. A composição lipídica é característica para cada reino, espécie, tecido e organela de certo tipo celular (SCOTT, 1973).

Os fosfolipídios, cujas cadeias de ácidos graxos são predominantemente poliinsaturadas, quando submetidos à redução da temperatura, assumem uma forma cônica, na qual as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas. Essa estrutura é denominada de forma “hexagonal II” ou micela invertida. Quando a membrana está em transição da fase fluída para a fase cristalina, para muitos lipídios, a formação dessa micela invertida é transitória; entretanto, para certos fosfolipídios, esta estrutura persiste. Como consequência, tem-se aumento da permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana, causando danos irreparáveis e perda de viabilidade (AMANN e PICKET, 1987; PARKS e GRAHAM, 1992; WATSON, 1995).

Capacitação e reação acrossômica

A capacitação espermática é um requisito necessário para que ocorra a fertilização e constitui de alterações na membrana plasmática que tornam os espermatozóides capazes de efetuar a reação acrossomal verdadeira, quando em condições fisiológicas, são expostos a uma glicoproteína que compõe a zona pelúcida do ovócito (BLEIL e WASSARMAN, 1983).

Os estágios iniciais da capacitação, nos ruminantes e primatas, ocorrem na cerviz, pela passagem dos espermatozóides nas microestruturas do muco cervical (HAFEZ, 1995; SCOTT, 2000), promovendo a remoção e alteração de componentes derivados dos testículos, como as glicoproteínas (THÉRIEN et al., 1998) e do plasma seminal que foram adsorvidos ou ligadas à membrana plasmática dos espermatozóides (MILLER e HUNTER, 1986; CHANDONNET et al., 1990). Das estruturas dos espermatozóides, a membrana plasmática é a que mais sofre mudanças durante a capacitação, principalmente por estar em contato direto com o meio capacitante. Entre as principais mudanças estão: depleção da relação colesterol/fosfolípido espermático na superfície (THÉRIEN et al., 1998; WOLFE et al., 1998; FLESCHE e GADELLA, 2000) permitindo aumento da fluidez da membrana, principalmente pelo aumento da concentração de fosfatidilcolina, desestabilizador de membrana; ocorrem também alterações nas glicosaminoglicanas; influxo de íons cálcio; aumento do nível de AMP cíclico e modificações de algumas atividades enzimáticas, principalmente a proteína quinase C (BAILEY e BUHR, 1993; FOURNIER-DELPECH et al., 1993; HAFEZ, 1995; O'FLAHERTY et al., 1997 e 1999; BILODEAU et al., 2000).

Há indícios que os processos de capacitação sejam estimulados por lipoproteínas de alta densidade (HDL), provenientes do fluído folicular ou do oviduto, e que proteínas do plasma seminal bovino (BSP's) aceleram a capacitação provida por seus indutores (THÉRIEN et al., 1995). Embora os radicais livres sejam tidos como prejudiciais aos espermatozóides, O'FLAHERTY et al. (1999) demonstram que quantidades controladas do ânion superóxido (O_2^-) são necessárias para os processos de hiperativação/capacitação e que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) participa como indutor da reação acrossomal em sêmen bovino. Desta maneira, DE LAMIRANDE e GANON (1993) mencionaram que a capacitação é parte de um processo oxidativo.

A capacitação termina com o evento de exocitose chamado de reação acrossomal, que tem como objetivo, permitir que os espermatozóides possam penetrar na zona pelúcida do ovócito (YANAGIMACHI, 1994).

Radicais livres e antioxidantes

Quimicamente, os radicais livres são substâncias que apresentam número ímpar de elétrons, sendo, portanto, altamente energéticos e instáveis. Podem ser formados pela ação direta de alguma fonte de energia externa (luz, calor e radiação), ou interna, próprio metabolismo (subprodutos da respiração celular), por reações catalisadas pelos metais (ferro e cobre) ou por enzimas. Essa energia ao atingir o átomo faz com que um elétron, seja removido do seu orbital, formando novo átomo contendo um elétron extra, denominado, radical livre, e para se tornar novamente estável, precisa liberar essa energia acumulada.

O termo espécies de oxigênio reativas (em inglês, ROS) se referem aos radicais livres ou espécies de oxigênio ativas, tais como, radical livre superóxido, radical hidroxil, peróxido de hidrogênio (que não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério) e oxigênio singlete, que podem causar injúria oxidativa em membranas lipídicas, proteínas trans membranas e carboidratos, danificando ácidos nucleicos e despolimerizando ácidos hialurônicos (OCHSENDORF, 1999).

A oxidação de lipídios é um exemplo típico de reação envolvendo radicais livres (ARAÚJO, 2001), e a velocidade da reação de oxidação depende do grau de insaturação na molécula do ácido graxo, assim, quanto maior o grau de insaturação, maior será a suscetibilidade à oxidação.

Desta maneira, os ácidos graxos insaturados podem ser atacados quimicamente pelo radical livre, fazendo com que ocorra reação propagadora de auto-oxidação, na formação de novos radicais livres (BOOTH e MCDONALD, 1992; ARAÚJO, 2001). Sendo a membrana espermática rica em ácidos graxos poliinsaturados (ZALATA e DEPUYDT, 1998; BAUMBER et al., 2000) torna-se altamente sensível as espécies reativas de oxigênio (ROS) (COMHAIRE e MAHMOUD et al., 1999; OCHSENDORF, 1999).

A maioria dos seres vivos possuem eficiente sistema de proteção capaz de neutralizar os efeitos maléficos ocasionados pelas espécies reativas formadas durante o metabolismo do oxigênio e da oxidação de lipídios. As células então possuem um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. Esses sistemas participam no bloqueio da ação dos radicais livres antes que eles causem a lesão ou como reparador da lesão ocorrida (ARAÚJO, 2001).

No sistema enzimático, diversas enzimas estão envolvidas nesse mecanismo: a superóxido dismutase (SOD), remove o radical superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio; a catalase (CAT) destrói o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e oxigênio; a glutathiona peroxidase (GPx) que é a mais importante na remoção de peróxido nas células; entre outras como a glutathiona (GSH), a glutathiona redutase (GR).

Essas enzimas estão presentes no plasma seminal e nos espermatozoides dos animais, na espécie bovina, as enzimas encontradas no plasma seminal foram a glutathione peroxidase, superóxido dismutase e a catalase (em baixa concentração) e nos espermatozoides foram principalmente a superóxido dismutase e baixas concentrações de glutathione peroxidase. Verificou-se ausência da catalase nos espermatozoides bovino, diferindo de outras espécies como no homem e ovino, nas quais a atividade da catalase foi detectada (BILODEAU et al., 2000).

Em relação ao sistema não enzimático faz parte compostos de baixo peso molecular, incluindo as vitaminas C e E, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

BILODEAU et al. (2000) sugeriram que o balanço entre a produção de ROS e a desintoxicação dos mesmos, pode ser importante fator de sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides antes, durante e após sua criopreservação, exercendo influência direta sobre a fertilidade. Eles notaram que o espermatozoide bovino é pouco adaptado para metabolizar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Observaram que a principal enzima antioxidante envolvida na desintoxicação das ROS no sêmen bovino são glutathione peroxidase e superóxido dismutase, a glutathione que é um cofator das enzimas também possui papel antioxidante. Segundo BECONI et al. (1993) e BILODEAU et al. (2000) as concentrações de glutathione e superóxido dismutase, respectivamente, são reduzidas significativamente no processo de criopreservação de sêmen bovino.

Os antioxidantes podem ser classificados como primários e secundários (ou sinérgicos). Os primários incluem os compostos fenólicos poliidroxilados (Galatos) e os fenóis com impedimento estrutural (Butil hidroxianisol - BHA, Butil hidroxitolueno - BHT, Butil hidroxiquinona - TBHQ e tocoferóis) e possuem a função de inibir a fase inicial da reação pela interação com os radicais livres, ou na etapa de propagação, reagindo com os radicais alcóxil ou peróxil, e ou, pela formação do complexo antioxidante-peróxil. Os sinérgicos são classificados de forma genérica como removedores de oxigênio e complexantes, sendo o ácido ascórbico o principal antioxidante deste grupo (ARAÚJO, 2001). Estes podem atuar na regeneração do radical fenóxil, doando hidrogênio e conseqüentemente regenerando o antioxidante primário. Essa interação entre os vários antioxidantes com a habilidade de regenerar outras espécies oxidadas (vitamina E, vitamina C e glutathione) é, talvez, mais importantes que a concentração destes no organismo (BUETTNER, 1993).

Vitamina E é o nome dado a um grupo de tocoferóis biologicamente ativos derivados de

componentes presentes nos vegetais. O principal composto ativo que ocorre naturalmente é o d- α -tocoferol, sendo a forma γ a menos ativa (BOOTH e MCDONALD, 1992; SWENSON et al., 1996).

Os ácidos graxos poliinsaturados contêm a configuração de $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ em que o hidrogênio no átomo de carbono central é facilmente removido, resultando na formação de um radical livre. Os elétrons no radical reajustam-se e é adicionado oxigênio para formar um peróxido. Os peróxidos podem romper-se para formar dois radicais livres, resultando numa reação de cadeia autopropagadora. Os antioxidantes atuam fornecendo hidrogênio para o radical livre e o estabiliza. O antioxidante torna-se um radical livre, mas tem a propriedade de poder reajustar-se em um conjunto estável e dessa maneira interromper a reação de propagação (SWENSON et al., 1996).

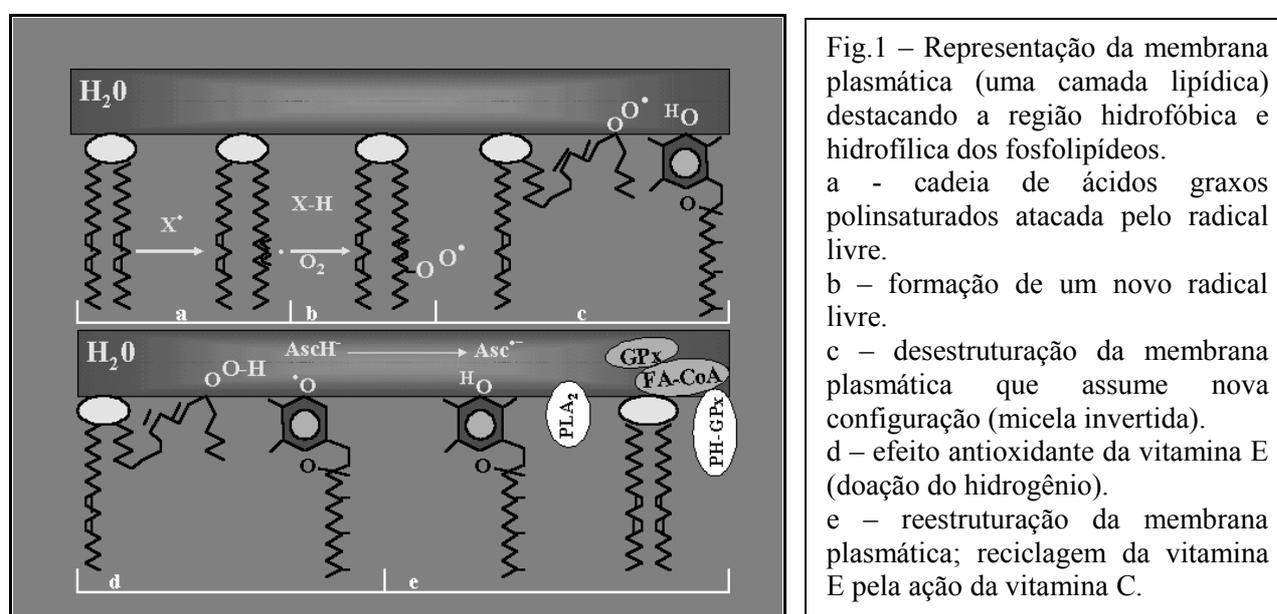


Fig.1 – Representação da membrana plasmática (uma camada lipídica) destacando a região hidrofóbica e hidrofílica dos fosfolipídeos.
a - cadeia de ácidos graxos poliinsaturados atacada pelo radical livre.
b - formação de um novo radical livre.
c - desestruturação da membrana plasmática que assume nova configuração (micela invertida).
d - efeito antioxidante da vitamina E (doação do hidrogênio).
e - reestruturação da membrana plasmática; reciclagem da vitamina E pela ação da vitamina C.

Fonte: BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* V.300, p 535-543, 1993.

A vitamina E é um inibidor reconhecido da peroxidação de lipídios em membranas biológicas (ERNSTER, 1993) e tem efeito de proteção na atividade metabólica e viabilidade celular de espermatozoides bovinos criopreservados (BECONI et al., 1993). Porém, O'FLAHERTY et al., (1997) não obtiveram modificações nos parâmetros de viabilidade espermática após a descongelação do sêmen contendo vitamina E.

Antioxidantes químicos não são efetivos como a vitamina E, pois não são estocados no corpo do animal (MCDOWELL et al., 2000), porém no caso do Trolox a vantagem é que sendo análogo da vitamina E, porém hidrossolúvel, sua utilização o torna conveniente para estudos em

sistemas biológicos naturais.

O 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico, posteriormente denominado de Trolox C (CORT et al., 1975), como dito anteriormente, é um análogo hidrossolúvel do tocoferol que foi sintetizado por Scott e sua equipe em 1974 e indicado como antioxidante para a preservação de óleos e gorduras tanto animal quanto vegetal. Sua atividade antioxidante em óleos vegetais e gordura animal é maior que a do α e γ -tocoferol (CORT et al., 1975). Seu mecanismo antioxidante é semelhante ao da vitamina E, ou seja, envolve o OH fenólico e a remoção de radicais peroxil (ALBERTINI e ABUJA, 1999).

O trolox é distribuído em ambas às fases da bicamada de lipídeos das biomembranas, tornando-se um excelente protetor contra a lipoperoxidação e, além disso, pode ser adicionado diretamente à membrana lipídica (sistema intacto) sem a necessidade de solventes ou outros métodos de extração (BARCLAY et al., 1995).

Diluidores e criopreservação espermática

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

Como visto anteriormente, existem diferenças na composição lipídica da membrana plasmática entre as espécies, raças e ainda entre indivíduos da mesma espécie, o que pode explicar o maior ou menor efeito protetor de um diluidor aos espermatozóides de um determinado indivíduo (HOLT, 2000), sendo que aqueles cujo sêmen tolera os efeitos da criopreservação são denominados de bons congeladores (WATSON, 2000).

Os sistemas tampões devem ser um dos constituintes dos diluidores, para que os íons hidrogênio produzidos pelo metabolismo dos espermatozóides sejam neutralizados, fazendo com que o pH da solução seja mantido próximo à neutralidade (6,8 a 7,1), pH ótimo para os espermatozóides. Os meios tampões mais utilizados nos diluidores para sêmen de bovinos são o citrato e o Tris (Tris-hidroximetil aminometano).

Os açúcares são adicionados ao meio diluidor como substratos exógenos de energia, além de componentes osmóticos. Os espermatozóides são capazes de metabolizar glicose, frutose e manose.

Antibióticos também são acrescentados ao meio diluidor para prevenir contaminações das amostras de sêmen, principalmente, durante a manipulação do mesmo. Os antibióticos comumente utilizados são a penicilina e a estreptomicina. Adicionalmente, CASH (1997) mostrou que a penicilina possui a função de impedir a peroxidação lipídica, podendo atuar sinergicamente na proteção de radicais livres.

A gema de ovo, particularmente seus componentes fosfolípidos, como a fosfatidilcolina (lecitina), possui ação protetora sobre membranas celulares. Em função de ocorrer uma interação dos fosfolípidios com os constituintes das membranas espermáticas, por meio da ocupação por parte desses lipídios, em sítios específicos da superfície das membranas. Por isso, tem sido acrescentada aos meios diluidores de várias espécies, com intuito de conferir maior proteção às membranas dos espermatozóides, durante o processamento do sêmen. No intuito de prevenir as lesões primárias associadas ao choque térmico, principalmente aquelas que alteram a permeabilidade da membrana (QUINN et al., 1980; ENGLAND, 1993; WATSON, 1995).

Com o objetivo de manter a integridade da membrana e aumentar a viabilidade espermática, experimentos utilizando antioxidantes (vitamina E, Trolox, vitamina C, catalase, superóxido dismutase, entre outros), como componente do diluidor, tem sido empregado em várias espécies (BECONI et al., 1993; AURICH e SCHONHERR, 1997; O'FLAHERTY et al., 1997 e 1999; UPRETI e JENSEN, 1998; BILODEAU et al., 2000 e 2002; BALL et al., 2001; BORGES, 2003; MAIA, 2006), sendo que os mesmos inibem ou diminuem a produção de radicais livres, entretanto podem não interferir nos parâmetros da viabilidade espermática (O'FLAHERTY et al., 1997).

Já os crioprotetores que são substâncias capazes de promover a sobrevivência celular durante o resfriamento, a congelação e descongelação, podem ser classificados de duas maneiras: intracelulares e extracelulares (AMANN e PICKETT, 1987). Entre os crioprotetores intracelulares, que são pequenas moléculas que atravessam a membrana plasmática e atuam no meio intracelular e extracelular, estão: o glicerol, etilenoglicol, acetamida, dimetilsulfóxido. Os crioprotetores extracelulares não atravessam as membranas plasmáticas, sendo formado por grandes moléculas como as proteínas presentes no leite e gema de ovo, açúcares como lactose, rafinose, trealose, metilcelulose entre outros (PICKETT e AMANN, 1993).

Os crioprotetores devem ser substâncias de baixo peso molecular e de baixa toxicidade para as células, embora todos os crioprotetores sejam tóxicos para as células em concentrações elevadas (FAHY, 1986).

O glicerol, um álcool polihídrico altamente permeável, é o crioprotetor mais empregado na congelação de sêmen nas diferentes espécies. Sua concentração ótima pode ser influenciada por outros componentes do diluidor, além da curva de resfriamento, e protocolo de congelação e descongelação. Contudo o fator determinante está relacionado com a espécie, embora seu efeito tóxico sobre os espermatozóides seja observado em elevadas concentrações, levando a perda da capacidade de fertilizar, o que pode ser restaurado quando o mesmo é removido (HOLT, 2000).

É durante o período de resfriamento que os espermatozóides interagem com os componentes da gema do ovo e adquirem resistência ao choque térmico e à criopreservação (WATSON, 1995), sendo este período o principal entrave no sucesso da congelação. As mudanças irreversíveis à membrana plasmática dos espermatozóides ocorrem de maneira geral entre 20°C e 5°C (QUINN et al., 1980; WATSON, 1995).

Dessa forma, a curva de resfriamento rápida imposta ao sêmen é responsável pela maioria das lesões celulares, em decorrência da alteração das propriedades físicas das membranas espermáticas (WATSON, 1981). O choque térmico, que ocorre durante a fase de transição (entre 20°C e 1°C) e caracteriza-se pela passagem da membrana plasmática do estágio líquido para o estágio cristalino (gel), causa mudanças irreversíveis à membrana plasmática dos espermatozóides, devido à ruptura e perdas de seus arranjos celulares (AMANN e PICKETT, 1987; HOLT, 2000). Essas alterações são associadas à diminuição da produção de energia (movimento circular ou perda prematura de motilidade) e aumento da permeabilidade da membrana.

A sensibilidade ao choque térmico varia de acordo com o grau de maturação dos espermatozóides, com a espécie, com a qualidade e quantidade do plasma seminal, podendo ser determinada pelo conteúdo de colesterol na membrana e o grau de saturação dos ácidos graxos (WATSON, 1981).

O tipo de fosfolipídios e a quantidade de proteínas presente na membrana plasmática também influenciam na sensibilidade ao choque térmico, sendo que espécies que possuem maior proporção de fosfatidil colina : fosfatidil etanolamina são mais resistentes, enquanto que espécies que possuem maior conteúdo de proteína são menos resistentes (PARKS e LYNCHY, 1992).

A curva de congelação é de extremamente importante na manutenção da integridade celular, pois se a mesma é rápida, não há tempo para que ocorra a desidratação dos espermatozóides, o que possibilita a formação de gelo intracelular, que é prejudicial à célula. Em casos de curva de congelação lenta, haverá a desidratação dos espermatozóides impedindo a formação de gelo intracelular, porém a alta concentração de solutos também pode causar danos à célula (WATSON, 1995).

Além das lesões sofridas pela membrana plasmática durante a congelação, também ocorrem danos durante o processo de reaquecimento da célula após a descongelação, uma vez que a membrana é submetida a rearranjos estruturais envolvendo lipídios e proteínas e a passagem rápida de água para o interior da célula pode causar o rompimento das membranas (WATSON, 1995; HOLT, 2000). Assim, a fase de descongelação é tão importante quanto à congelação para a sobrevivência da célula. O protocolo de descongelação preconizado para bovinos é de 35°C, por no mínimo 20 segundos, para palhetas de 0,25mL.

Testes complementares

Para serem férteis, os espermatozóides devem ser capazes de expressar várias características, em uma determinada ordem e tempo. Além disso, número suficiente de espermatozóides férteis deve estar presente na proximidade dos oócitos, para ocorrência da fecundação. Sendo que estes devem apresentar pelo menos quatro atributos básicos pós-descongelação, tais como: metabolismo para produção de energia; motilidade progressiva; enzimas acrossomais intactas necessárias para a penetração dos espermatozóides através das estruturas que circundam o oócito; proteínas da membrana plasmática importante para a sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino e para a junção dos mesmos ao oócito no momento da fertilização (AMANN e PICKET, 1987).

No entanto, predição da capacidade fecundante de amostras de sêmen pode não ser precisa com a realização de um único teste *in vitro*, porém quando os métodos *in vitro* são usados em conjunto, aumenta-se a acurácia em predizer o potencial de fertilidade do sêmen criopreservado (SIKKA, 1996). Dentre esses métodos, *in vitro*, podemos incluir os que avaliam as características do movimento espermático, potencial de membrana mitocondrial, a integridade da membrana plasmática e acrossomal, a capacidade de penetração no muco cervical, a capacidade e reação acrossomal, o reconhecimento da zona pelúcida, a fusão espermatozóide-oócito, o grau de estresse oxidativo sofrido pelo espermatozóide e a integridade do seu DNA.

No entanto, ainda falta um consenso dos testes laboratoriais para avaliar a verdadeira fertilidade do espermatozóide. Desta forma, métodos concretos de avaliação do sêmen pós-descongelação, bem como sua viabilidade, possuem significado econômico de suma importância (FAZELI et al., 1997; RODRIGUEZ MARTINEZ et al., 1997).

Características Físicas e Morfológicas do Sêmen

FONSECA (1999) relata que dentre os aspectos físicos do sêmen, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático são as características mais avaliadas para prever a qualidade seminal a campo. Segundo o autor, estes parâmetros são de grande importância e pode revelar, por si só, a existência de distúrbios bioquímicos no sêmen, associados ou não com alterações da espermiogênese. Entretanto, STALHAMMAR et al. (1994), ressaltam as limitações da análise isolada da motilidade espermática progressiva como critério único de avaliação de sêmen bovino.

A evidência de relação entre morfologia espermática e fertilidade de touros foi descrita primeiramente por Williams e Savage em 1927, citados por vários autores que avaliaram sêmen bovino tanto *in natura* quanto criopreservado (RAO et al., 1980; SÖDERQUIST et al. 1991).

BARTH e OKO (1989) citam a importância da morfologia espermática na indicação do estágio de normalidade da motilidade espermática progressiva e da produção espermática. Segundo os autores, a qualidade do sêmen por meio do estudo da morfologia das células espermáticas reflete a saúde dos túbulos seminíferos, epidídimos e glândulas anexas.

Diversos autores têm relatado que estes parâmetros, embora importantes, não podem avaliar conclusivamente a capacidade de fecundação do sêmen (AMANN, 1989; FAZELI et al., 1997; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997), sobretudo quando se avalia o sêmen descongelado e o relaciona com índices obtidos a campo.

Dessa forma, faz-se problema para as indústrias de inseminação artificial, nas espécies de animais de produção, a diferença encontrada na fertilidade sem que ocorra maior diferença na motilidade e morfologia espermática, exceto nos casos mais severos (FAZELI et al., 1997). Tal fato assume grande importância uma vez que, na maioria dos casos, os touros doadores de sêmen têm sido selecionados com base nas características físicas e morfológicas do sêmen (SILVA, 2000).

Teste de termo-resistência

O teste de termo-resistência (TTR) consiste na incubação de uma amostra de sêmen descongelado, em banho-maria, por tempo pré-estabelecido, sob determinada temperatura, avaliando-se a motilidade progressiva e o vigor espermático (DIMITROPOULOS, 1967).

O teste de termo resistência rápido aplicado na avaliação de sêmen bovino congelado constituiu-se como uma prova de grande aplicabilidade (ARRUDA et al., 1997), especialmente por sua correlação com fertilidade a campo. Outros trabalhos verificaram a associação da resistência dos espermatozóides imposta ao período de incubação estabelecida em testes de termo resistência com importantes implicações fisiológicas e práticas, sendo que as correlações

com fertilidade *in vitro* e a campo mostraram-se presentes (VISHWANATH e SHANNON, 1997).

De acordo com HENRY e NEVES (1998) o sêmen bovino será considerado de boa qualidade se a amostra apresentar ao final do teste pelo menos 15% de motilidade espermática progressiva retilínea e três de vigor espermático.

Teste Hiposmótico

O teste hiposmótico (HIPO) tem sido um dos métodos utilizados para avaliar a integridade funcional da membrana das células espermáticas em várias espécies: humana (JEYENDRAN et al., 1984), caprina (FONSECA et al., 2001; MARTINS, 2001), canina (BUENO, 2000; OLIVEIRA, 2003), suína (VAZQUEZ et al., 1997), eqüina (NEILD e GADELLA, 2002; FÜRST, 2002; SANTOS, 2003) e bovina (REVELL e MRODE, 1994; CORREA et al., 1994 e 1997; ROTA et al., 2000, BORGES, 2003; SIQUEIRA et al., 2007).

Uma das propriedades da membrana celular é o transporte seletivo de moléculas que pode ser observado quando a célula é exposta a condições hiposmóticas, permitindo a entrada de água através da membrana plasmática, para o meio intracelular, até atingir um equilíbrio osmótico. Esse processo ocorre somente nas células que possuem a membrana plasmática viável e devido ao influxo de água, ocorre edema celular, visualizado com enrolamento na região da cauda, local de maior susceptibilidade (JEYENDRAN et al., 1984).

Altas correlações entre teste hiposmótico e fertilidade de amostras de sêmen bovino congeladas foram verificadas em programas de inseminação artificial (REVELL e MRODE, 1994; CORREA et al., 1997). Entretanto, testes realizados *in vitro*, observaram correlações baixas e negativas entre teste hiposmótico de sêmen congelado e fertilidade (ROTA et al., 2000).

Teste de Integridade da Membrana Plasmática (Fluorescência)

Recentemente, maior atenção tem sido dispensada à avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides, considerando sua integridade como requisito fundamental no processo de fertilização.

CROSS e MEIZEL (1989) reportaram que existem diferentes métodos que podem ser empregados para a avaliação do acrossoma espermático, como microscopia de contraste de fase, colorações específicas para visualização do acrossoma, em microscopia óptica convencional e marcadores fluorescentes, sendo que cada um dos métodos apresenta fatores positivos e negativos.

A utilização de corantes fluorescentes como Hoechst 33258 (H258), iodeto de propídio (IP), diacetato de carboxifluoresceína (DIC), entre outros, tem sido empregados para facilitar a visualização do acrossoma em diversas espécies, uma vez que os mesmos fornecem meios para detectar componentes específicos dentro de uma célula com acurada sensibilidade e seletividade (HARRISON e VICKERS, 1990; DEN LEEUW et al., 1991; VALCARCEL et al., 1994; ZÚCCARI, 1998; AZERÊDO, 1999; SOUZA, 2001; OLIVEIRA, 2003; SANTOS, 2003; BORGES, 2003; MAIA, 2006).

Vários trabalhos utilizaram os corantes DIC e IP para a realização do teste de integridade da membrana plasmática. HARRISON e VICKERS (1990) preconizaram um método onde adicionaram baixa concentração de formaldeído às soluções de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e o iodeto de propídio (IP) para imobilizar as células espermáticas sem causar danos estruturais às mesmas, permitindo a análise por meio de microscópio de fluorescência. Esse método foi modificado por ZÚCCARI (1998), onde a autora descreve um protocolo que utiliza o meio com citrato de sódio ao invés de meio TALP na solução trabalho. Sobre ação das esterases as células liberam carboxifluoresceína livre (impermeáveis às membranas) que acumulam no interior do acrossoma, mitocôndria e citoplasma. Esse acúmulo de DIC nos espermatozoides íntegros foi visualizado pela coloração verde fluorescente, já as células espermáticas que apresentam lesões na membrana plasmática podem ser coradas de vermelho pelo IP, corante de DNA, sendo impermeável à membrana íntegra.

Testes de atividade citoquímica (Coloração DAB)

Os espermatozoides são células metabolicamente ativas, possuindo enzimas necessárias para realizar as reações de glicólise, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, da oxidação dos ácidos graxos, transporte de elétrons e provavelmente, a via das manoses. Dois processos metabólicos denominados glicólise e respiração mantêm um adequado balanço energético às células espermáticas, sendo suas taxas dependentes da concentração e motilidade dos espermatozoides no sêmen. Na glicólise anaeróbica, que no touro seria frutólise anaeróbica, já que a frutose é o principal açúcar no plasma seminal, o espermatozoide degrada a frutose, glicose ou manose com conseqüente produção de ácido láctico, permitindo aos espermatozoides sobreviverem em condições anaeróbicas durante a estocagem para posterior uso em inseminação artificial (BARBOSA, 1996).

Em presença de oxigênio, os espermatozoides utilizam uma série de subprodutos incluindo o ácido láctico, ácido pirúvico, ácido acético, glicerol, ácidos graxos, certos aminoácidos e sorbitol. Esta via oxidativa, denominada respiração mitocondrial, é mais eficiente

na produção de energia do que a frutólise. Usando estes processos catabólicos, os espermatozóides convertem a maior parte de energia em ATP (adenosina trifosfato). A maior parte do ATP é utilizada na motilidade espermática, que é um processo consumidor de energia (AMELAR et al., 1980; HAFEZ, 1995; BARBOSA, 1996).

Uma das técnicas utilizadas para quantificar a atividade respiratória em espermatozóides é a descrita por HRUDKA (1987), em que a atividade da enzima citocromo C oxidase no espermatozóide é quantificada sob microscopia de luz. A técnica citoquímica era baseada na oxidação do 3,3' diaminobenzidina (DAB) pelo complexo citocromo C oxidase, numa reação em cadeia, na qual o reagente era polimerizado e depositado no local de reação. O depósito podia ser identificado por sua cor, restrita às mitocôndrias sob microscopia comum. A atividade era prontamente inibida por KCN, um inibidor específico da enzima, ou pelo calor (70°C/ 5min) no espermatozóide. Este procedimento foi testado para sua especificidade e validado em várias espécies, tanto no sêmen recém colhido como no criopreservado.

Teste de TUNEL

Apoptose, ou morte celular programada é característica no desenvolvimento de animais e plantas e é tão importante quanto o processo mitótico para a formação de um indivíduo. É observada em condições normais no desenvolvimento de embriões *in vivo* e *in vitro* do início de desenvolvimento de embriões (NEUBER et al., 2002). O índice de células em apoptose pode indicar a qualidade de blastocistos produzidos.

Uma série de eventos bioquímicos e morfológicos ocorre no núcleo e citoplasma da célula em apoptose. A condensação e fragmentação do DNA nuclear estão associadas com a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas e aumento do retículo endoplasmático (HALL, 1990). O ensaio TUNEL, detecta células que iniciaram o processo de morte celular, pois a enzima terminal “deoxynucleotidyl transferase” (TdT) catalisa a incorporação de “biotinylated deoxyuridine” (dUTP) nos locais de quebra de DNA e o sinal é amplificado por fluorescência.

Produção in vitro de Embriões e Inseminação Artificial

Como visto anteriormente, nenhum parâmetro isolado de qualidade de sêmen fornece informação com devida confiabilidade para fertilidade, pois os resultados demonstram complexidade do processo de fertilização. Sendo assim, a associação de testes complementares *in vitro*, possuem maior acurácia em predizer a fertilidade do sêmen *in vivo* (SILVA, 2000), pois

as características presentes nos espermatozoides férteis não são avaliadas por único método de avaliação (SIKKA, 1996; BUENO, 2000).

Porém o teste de fertilização *in vitro* possui maior correlação com a fertilidade (WHITHFIELD e PARKINSON, 1995), embora sem dúvida alguma, o melhor indicador seja a taxa de prenhez. Por isso, testes *in vitro* e *in vivo* tornam-se complementares.

Método de Separação Espermática

A preparação dos espermatozoides para a fecundação *in vitro* (FIV), em bovinos, envolve usualmente, procedimentos para separar os espermatozoides do plasma seminal, diluidor e/ou crioprotetores, sendo que os métodos comumente utilizados são técnica do sedimento – “swim up” (PARRISH et al., 1984), separação por gradiente descontínuo de Percoll (AVERY e GREVE, 1995) e lavagem mediante centrifugação (JAAKMA, et al., 1997). Estes procedimentos também selecionam e concentram os espermatozoides normais de maior motilidade para a FIV. Entretanto, existem divergências em relação aos resultados obtidos com a utilização destes métodos e observa-se que a viabilidade pós-descongelamento ainda é significativamente afetada pelo diluidor do sêmen (ANZAR e GRAHAN, 1995), podendo interferir nos subseqüentes processos de fecundação e/ou desenvolvimento embrionário

A adição de antioxidante no diluidor do sêmen tem o intuito de reduzir os níveis de radicais livres e, conseqüentemente, evitar a lipoperoxidação da membrana plasmática dos espermatozoides, mantendo sua viabilidade e aumentando as taxas de clivagem e de blastocisto.

Em síntese, as mudanças na estrutura e função das células espermáticas, principalmente no acrossoma, mitocôndria e membrana plasmática, determinam sua viabilidade pós-descongelamento. Deste modo, buscando melhorar a manutenção das estruturas e funções espermáticas após o processo de criopreservação, o presente trabalho foi realizado com objetivo de avaliar o meio diluidor contendo antioxidante na manutenção da viabilidade espermática, por meio de testes *in vitro*: teste de termo-resistência lento, teste hiposmótico, teste de fluorescência, teste de atividade mitocondrial e a fecundação *in vitro*, e a inseminação artificial como testes *in vivo*.

HIPÓTESES

A adição de antioxidante ao diluidor protegerá a membrana plasmática dos espermatozoides bovinos durante o processo de criopreservação, aumentando a viabilidade das células espermáticas, melhorando a taxa de prenhez e a produção de embriões *in vitro*.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o efeito do diluidor contendo antioxidante sobre o processo de criopreservação de sêmen bovino, buscando melhorar a viabilidade espermática.

Específicos

Avaliar o efeito do antioxidante ao diluidor na sobrevivência, motilidade espermática, integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial dos espermatozoides bovinos antes e após o processo de criopreservação;

Avaliar o efeito do antioxidante ao diluidor pela taxa de prenhez dos animais inseminados;

Avaliar o efeito do antioxidante ao diluidor na produção de embriões produzidos *in vitro*, utilizando dois métodos de separação espermática;

Analisar a taxa de fragmentação de DNA produzida *in vitro* a partir de oócitos fecundados por sêmen criopreservado com diluidor contendo antioxidante.

CAPÍTULO 2 - UTILIZAÇÃO DE TESTES COMPLEMENTARES E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO COM DILUIDOR CONTENDO ANTIOXIDANTE

Título

Utilização de Testes Complementares e Inseminação Artificial para Avaliação da Qualidade do Sêmen Bovino Criopreservado com Diluidor contendo Antioxidante

Resumo

O processo de criopreservação promove diversas alterações estruturais e funcionais nos espermatozoides, podendo comprometer a viabilidade das células pós-descongelamento. Uma das alterações é a modificação da membrana plasmática devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio. O objetivo da utilização do diluidor contendo antioxidante foi verificar *in vitro*, por meio da realização dos testes complementares, avaliar a qualidade, viabilidade e integridade das células espermáticas após o processo de criopreservação, e verificar *in vivo*, por meio da inseminação artificial, a capacidade fecundante. Nesta pesquisa utilizaram-se cinco touros da raça Nelore, doadores de sêmen, mantidos sob as mesmas condições em Central de Inseminação Artificial. Doze ejaculados de cada touro foram coletados, sendo que cada ejaculado foi distribuído em duas partes iguais e criopreservado com diluidor controle Tris (Dil C) e com diluidor antioxidante Tris + Trolox 200 μ M (Dil T). Após a coleta com vagina artificial, parâmetros como turbilhonamento, motilidade, vigor e exame de morfologia espermática e teste hiposmótico foram realizados no sêmen *in natura*. Parâmetros como motilidade/vigor, teste hiposmótico, teste de integridade de membrana (fluorescência) foram realizados após a diluição e pós-descongelamento, sendo que pós-descongelamento também se avaliou a atividade das mitocôndrias pelo teste de atividade citotóxica (coloração DAB). Após três horas de incubação (pós-descongelamento) à temperatura de 37°C, foram avaliadas novamente a motilidade/vigor das células espermáticas. No experimento *in vivo* foram inseminadas 300 novilhas da raça Nelore, sendo que para cada touro realizou-se 60 inseminações. Observou-se efeito do touro em todos os parâmetros espermáticos avaliados, o que demonstrou o indivíduo ser um fator importante. O tratamento não influenciou ($p > 0,05$) os parâmetros espermáticos quando comparados os cinco touros. Porém, ao dividir os animais em duas categorias (TP= touros problemas e TN= touros normais) em relação à porcentagem de defeitos morfológicos espermáticos, observou-se que eles responderam diferentemente ao tratamento com o diluidor contendo antioxidante, ou seja,

animais que apresentavam maior porcentagem de patologia espermática responderam positivamente ($p < 0,06$) ao tratamento com antioxidante.

Palavras – Chave: Antioxidante, Bovino, Criopreservação, Diluidores, Membrana Plasmática, Sêmen.

Abstract

There are detrimental effects of oxygen-derived free radicals on the sperm during cryopreservation, main in the plasma membrane and DNA due to lipoperoxidation. The objective of the use the extender containing antioxidant was verified *in vitro*, by the realization the complementary tests, the quality, viability and integrity of the spermatic cells after the cryopreservation process, and was showed *in vivo*, by the artificial insemination, the fecundity capacity. In this study it was used five Nelore bulls, semen donate, maintained under same conditions in the Centre Artificial Insemination. Twelve ejaculates of each bull were collected, and each ejaculate was allocated in equal parts and cryopeserved with TRIS - extender (control) and antioxidant extender (control + Tocoferol 200 μ M). After collection with artificial vagina, parameter as, motility, vigor, morphological spermatozoa and hyposmotic test was realized in nature semen. After dilution was observed hyposmotic test and plasma membrane integrity test and the same post thawed with more the cytochemic activity test and thermal resistance test. It was inseminated 300 Nelore heifers, and each bull realized 60 artificial inseminations. The treatment showed no difference ($p > 0.05$) for all parameters evaluated when compared to the five bulls, however, allocated the bulls in two categories (high sperm pathology vs. normal morphology) and it was observed that they responded differently to treatment with antioxidant in the extender. This way, animals that offered more spermatic pathology showed better pregnancy rate ($p < 0.06$) with antioxidant in the extender.

Key - words: Antioxidant, Bovine, Criopreservation, Extenders, Plasmatic membrane, Semen.

Introdução

Dentre as biotecnologias aplicadas à reprodução de bovinos, a inseminação artificial (IA) é a que demonstra maior difusão, embora ainda restrita a, aproximadamente, 7% do rebanho brasileiro (ANUALPEC, 2006).

O sêmen de boa qualidade é um dos fatores de fundamental importância para o sucesso da IA, por isso seu processamento deve preservá-lo ao máximo. O processo de criopreservação promove diversas alterações estruturais e funcionais no espermatozóide, podendo comprometer a viabilidade das células pós-descongelamento, devido ao gradiente osmótico gerado entre o meio intra e extracelular, que podem resultar em danos à membrana plasmática e acrossomal, bem como a outras estruturas espermáticas. Uma das alterações é a modificação da membrana plasmática pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio.

Para serem férteis, os espermatozóides devem ser capazes de expressar várias características, em uma determinada ordem e tempo. Além disso, número suficiente de espermatozóides férteis deve estar presente na proximidade dos oócitos, para ocorrência da fecundação. Sendo que estes devem apresentar pelo menos quatro atributos básicos pós-descongelamento, tais como: metabolismo para produção de energia; motilidade progressiva; enzimas acrossomais, necessárias para a penetração dos espermatozóides através das estruturas que circundam o oócito; proteínas da membrana plasmática intactas, importante para a sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino e para a junção dos mesmos ao oócito no momento da fertilização (AMANN e PICKET, 1987).

Com o objetivo de manter a integridade da membrana e aumentar a viabilidade espermática, experimentos utilizando antioxidantes (vitamina E, vitamina C, catalase, superóxido dismutase, entre outros), como componente do diluidor, tem sido empregado em várias espécies (TRINCHERO et al., 1990; BECONI et al., 1993; AURICH e SCHONHERR, 1997; O'FLAHERTY et al., 1997 e 1999; UPRETI e JENSEN, 1997 e 1998; BILODEAU et al., 2000 e 2002 e BALL et al., 2001), sendo que os mesmos diminuem a produção de radicais livres, protegendo a membrana plasmática do espermatozóide contra a lipoperoxidação. Porém, algumas vezes não interferiram nos parâmetros da viabilidade espermática (O'FLAHERTY et al., 1997).

Trolox C (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E, protege as células dos radicais de oxigênio *in vivo* (CHOW, 1979;

MILLER e BRZEZINSKA – SLEBODZINSKA., 1993) e *in vitro*, atuando na quebra da reação em cadeia da lipoperoxidação.

A predição da capacidade fecundante de amostras de sêmen pode não ser precisa com a realização de um único teste *in vitro*, porém quando os métodos *in vitro* são usados em conjunto, aumenta-se a acurácia em predizer o potencial de fertilidade do sêmen criopreservado (SIKKA, 1996). Quando os testes complementares *in vitro* associam-se com o teste *in vivo*, taxa de prenhez proveniente da inseminação artificial, os resultados tornam-se mais confiáveis.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de testar a utilização do diluidor contendo antioxidante na manutenção da viabilidade dos espermatozóides, avaliando por testes complementares *in vitro*, as células espermáticas após o processo de criopreservação, e no *in vivo*, por meio da inseminação artificial, a taxa de prenhez.

Material e Métodos

Coleta de Sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas em uma empresa de Inseminação Artificial e os animais foram selecionados conforme sua disponibilidade na escala de produção de sêmen, sendo todos eles mantidos sob mesmas condições de manejo e com idades variáveis, entre 7 e 12 anos.

Foram utilizados cinco touros da raça Nelore, utilizados na rotina de coleta da central, sendo coletados doze ejaculados por touro, totalizando 60 repetições.

Para a obtenção dos ejaculados, empregou-se o método da vagina artificial com auxílio de uma fêmea em estro, contida, com sessões de coletas intercaladas por 36 a 72 horas, sendo o procedimento de coleta executado pelos mesmos técnicos.

Para recepção dos ejaculados, nas coletas foram utilizados tubos de vidro coletores graduados, acoplados a uma extremidade da vagina artificial e previamente aquecidos a 37°C e protegidos contra luminosidade por meio de capa protetora.

Imediatamente após a coleta, os tubos coletores foram colocados em banho-maria a 35°C, sendo mantidos durante todo processo de avaliação dos aspectos físicos e diluição do sêmen, quando então foram submetidos ao processo de refrigeração.

O volume foi mensurado pelo tubo coletor graduado.

Aspectos Físicos e Morfológicos do Sêmen

Uma gota de sêmen de cada ejaculado foi colocada na lâmina, previamente aquecida a 37°C (placa aquecedora), para observação do turbilhonamento (escala de zero a cinco) em microscópio óptico com aumento de 100 vezes. Outra gota para motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C para avaliar a motilidade espermática progressiva retilínea (expressa em porcentagem) e o vigor espermático (escala de zero a cinco) com aumento de 100 a 400 vezes.

A concentração espermática de cada ejaculado foi determinada com a utilização dos equipamentos Coulter Z1 – Beckman e Microlab 500 – Hamilton.

Para efetuar a análise da morfologia espermática, retirou-se uma alíquota de sêmen, que foi diluída em solução de formol salina tamponada (HANCOCK, 1957). A patologia foi avaliada em preparações úmidas, entre lâmina e lamínula, num aumento de 1250 vezes sob objetiva de imersão, em microscopia de contraste de fase. Em cada preparação foram avaliadas 400 células, e determinou-se o percentual de espermatozoides normais e de anomalias de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda (BLOM, 1973). Posteriormente, os defeitos foram classificados de acordo com HENRY e NEVES (1998).

Meios Diluidores de Criopreservação

Neste experimento o diluidor utilizado como controle foi o TRIS – gema: ácido cítrico (1,5g/dL), Hidroximetilaminometano – TRIS (2,42g/dL), glicose (1,25g/dL), gema de ovo (20mL/dL), penicilina (1000UI/mL), estreptomicina (1000µg/mL), glicerol (6 mL/dL) e água destilada 100mL qsp. O grupo com antioxidante utilizou o mesmo diluidor acrescido de 200µM Trolox.

Após a coleta das amostras de sêmen e das avaliações físicas do mesmo, os ejaculados foram divididos em duas frações iguais, sendo uma fração diluída com diluidor controle (Dil C) e a outra com o diluidor controle+Trolox (Dil T).

Os dois tratamentos foram:

Tratamento 1 (Dil C)- Diluidor Controle (Tris-gema);

Tratamento 2 (Dil T)- Diluidor Controle + Trolox¹ (200µM)

Após o cálculo da concentração do ejaculado foi efetuado o seguinte cálculo:

$\text{Total de células móveis}/25 \times 10^6 \text{ por palheta} = \text{número de doses} \times \text{o volume útil da palheta} \\ (0,225\text{mL}) = \text{volume total} - \text{volume de sêmen} = \text{volume à acrescentar de diluente}$
--

Preparação das Soluções Estoques

¹ Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico) – Aldrich)

Uma concentração de 200µM de Trolox foi diluída em água mili-Q. A homogeneização foi intensa, porém, cuidadosa para que bolhas não fossem formadas.

Diluição Final

O volume do diluidor acrescentado para completar-se a diluição final antes do resfriamento do sêmen foi calculado com base na concentração espermática do ejaculado, sendo que a dose inseminante foi fixada em 25 milhões de espermatozóides para a palheta de acetato de polietileno de 0,25mL, para todos os tratamentos.

O Trolox foi adicionado e homogeneizado ao diluidor e acrescentado na diluição final, sendo fixado em 20µL para cada 100 x 10⁶ espermatozóides por mL. O cálculo foi realizado do seguinte modo:

	Concentração de	X	volume do	÷	100 x 10 ⁶
sptz	Sptzs móveis/ mL		ejaculado (para esse diluidor)		

O resultado obtido multiplicado por 20 corresponde ao total de trolox em µL a adicionar na diluição final do Dil T (tratamento 2).

Após a diluição final, cada tratamento que já se encontrava acondicionado em erlenmeyer, foi agrupado em um recipiente de plástico que continha água a 35°C. Os tratamentos acondicionados nesse “banho-maria” eram levados para câmara fria, a qual se encontrava a 4°C. Todo o procedimento inicial do sêmen expendeu, no máximo, 30 minutos, até que o sêmen fosse coletado e submetido ao resfriamento.

Resfriamento, Congelação e Descongelção

Os erlenmeyers contendo o sêmen permaneceram na câmara fria por uma hora, período este de resfriamento e por no mínimo mais três horas (período de equilíbrio), totalizando cinco horas até que fossem envasados com a utilização do equipamento marca – IMV, modelo – MRS 3 e congelados. A curva de resfriamento foi de aproximadamente 0,55°C/minuto.

A congelação foi realizada pelo Digitcool, um aparelho computadorizado (marca - IMV, modelo – 5300), e a curva obedecia aos padrões da empresa. As palhetas eram armazenadas em

canecas de plástico, e mergulhadas no nitrogênio líquido, em seguida foram acondicionadas em *canister* apropriado e armazenadas em botijões com nitrogênio líquido até o momento de sua utilização.

A descongelação do sêmen foi realizada em banho-maria a 35°C, por no mínimo 20 segundos. Após a descongelação da palheta o sêmen foi transferido para microtubos de 1,5 mL, previamente aquecidos em banho-maria a mesma temperatura, e permaneceram incubados a 37°C para serem avaliados.

Experimento 1:

Testes Complementares

As amostras de sêmen, referentes aos dois tratamentos propostos neste estudo, foram avaliadas após a coleta, a diluição e a descongelação, sendo a motilidade espermática progressiva retilínea e o vigor espermático avaliados segundo a metodologia descrita anteriormente. Posteriormente, as amostras de sêmen criopreservado foram reservadas para realização dos testes complementares.

Teste de Termo-Resistência Lento Modificado

A longevidade dos espermatozoides foi avaliada pelo teste de termo-resistência lento modificado ou teste de incubação nas amostras de cada partida de sêmen dos touros utilizados neste experimento, logo após a descongelação para cada tratamento. O teste consistiu em colocar duas amostras de sêmen de 0,25 mL, em um microtubo de 1,5 mL, e submetê-las a incubação a 37°C, durante três horas e a cada 60 minutos foram avaliadas quanto à motilidade progressiva retilínea e vigor espermáticos de acordo com DIMITROPOULOS (1967) modificado.

Teste Hiposmótico

A integridade da membrana plasmática foi avaliada logo após a coleta, diluição e descongelação para cada tratamento, por meio do teste hipomótico (HO), utilizando 1,0 mL de uma solução com frutose na concentração de 100 mOsm/Kg, (Tabela 1, Anexo), previamente aquecida a 37°C, acrescida de 20µL de sêmen. Essa solução foi incubada por 60 minutos a

mesma temperatura. Após esse período, uma amostra da solução de 20µL foi colocada entre lâmina e lamínula e seguiu-se a contagem de 100 espermatozóides, em microscopia de contraste de fase, em aumento de 400X. As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda enrolada (Figura.1). O resultado foi determinado em porcentagem, sendo o cálculo realizado pela seguinte fórmula:

HIPO (%) = (% de alterações na região da cauda após teste HIPO) – (% de alterações na região da cauda dos espermatozóides antes do teste HIPO) (REVELL e MRODE, 1994).



Fig 1 – Seta indicando célula espermática reativa ao teste hiposmótico, ou seja, com membrana plasmática íntegra, em microscopia de contraste de fase, aumento de 400X.

Teste de Integridade da Membrana Plasmática (Fluorescência)

Outro método para visualizar a integridade de membrana foi a utilização da associação de dois corantes fluorescentes, o diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e o iodeto de propídio (IP), para identificação de células íntegras, lesadas ou semi-lesadas, segundo HARISON e VICKERS (1990); e modificada por ZÚCCARI (1998), onde as células espermáticas apresentavam as seguintes características de coloração:

- Íntegros – espermatozóides com membrana plasmática íntegra, células coradas pelo DIC, apresentando-se verde fluorescente em toda sua extensão.
- Lesados - espermatozóides com membrana plasmática e acrossomal lesadas, células coradas pelo IP, apresentando-se vermelhas fluorescentes.
- Semi-lesados - espermatozóides com membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra, células coradas de verde (DIC) na região do acrossoma e núcleo corado de vermelho (IP).

Amostras de sêmen foram avaliadas após a diluição e a descongelação a 35°C, por no mínimo 20 segundos. Amostras de 10µL de sêmen foram adicionadas a 40µL de solução trabalho, que se encontrava a temperatura ambiente e em microtubos revestidos por papel alumínio, sendo esse procedimento efetuado com o mínimo de luminosidade possível. Após a adição do sêmen na solução trabalho, a leitura das lâminas foi realizada em seguida ou até 12

horas após a homogeneização, para amostras descongeladas e para amostras diluídas, respectivamente, sendo avaliadas 100 células por amostra de cada partida.

Após a preparação da lâmina (preparação úmida) em temperatura ambiente, as amostras foram avaliadas, ao abrigo da luz, em microscópio de fluorescência, utilizando filtros de 480 a 610 nm (fluoresceína e rodamina, respectivamente) e aumento de 1250X com objetiva de imersão.

Todas as soluções foram preparadas ao abrigo da luz e eram mantidas congeladas a -20°C até o momento da análise do sêmen, onde se encontravam à temperatura ambiente. As soluções trabalho foram aproveitadas (congeladas e descongeladas) quatro vezes no máximo para evitar perda da fluorescência. As soluções utilizadas no preparo desta coloração estão discriminadas na Tabela 2, Anexo.

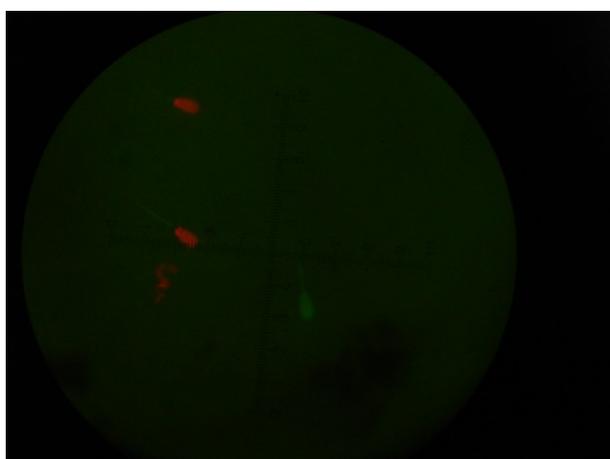


Fig 2 – Célula espermática vermelha, com membrana plasmática lesada e célula espermática verde com membrana plasmática íntegra, pelo teste de fluorescência, observada em microscópio de fluorescência, em aumento de 1250X.

Teste de Atividade Citoquímica (Coloração DAB)

A atividade citoquímica foi determinada no sêmen descongelado sendo o método utilizado o descrito por HRUDKA (1987).

Duas palhetas de quatro ejaculados de cada touro foram descongeladas a 35°C por 20 seg e o conteúdo reunido em um microtubo de 1,5mL; o meio de incubação, o doador de elétron 3,3' – diaminobenzidina (DAB) foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,15M, pH 7,2, a uma concentração de 1mg/mL, e manuseado na ausência de luz; uma alíquota de 250 μL de sêmen foi adicionada a 750 μL do meio de incubação, homogeneizado e mantido em um microtubo aberto em banho maria a 37°C , durante 60min na ausência de luminosidade. O controle negativo era obtido a cada ensaio realizado, pela incubação de uma amostra de sêmen e meio de incubação, aquecida a 70°C , por 5min. Foram preparados então esfregaços de cada suspensão incubada de

espermatozóides. Os esfregaços foram secos ao ar, fixados em formaldeído 10% por 10min, lavados e secos ao ar.

As avaliações foram realizadas em aumento de 1250X, sob imersão em óleo, usando microscopia de contraste de fase. Foram classificados 200 espermatozóides por touro e a avaliação da atividade mitocondrial da peça intermediária dos espermatozóides seguiu a escala de quatro classes proposta por HRUDKA (1987), onde:

- Classe 1– quase todas as mitocôndrias são ativas, ou seja contém um produto de reação enegrecida dando a bainha mitocondrial a aparência de um cilindro compacto e proeminente.
- Classe 2 – a bainha mitocondrial aparece fragmentada, isto é, consiste em segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos
- Classe 3 - espermatozóides com menos da metade da bainha mitocondrial ativa e com poucas mitocôndrias ativas dispersas.
- Classe 4 – espermatozóides completamente inativos.

Cada classe da escala foi multiplicada por um fator de correção, como segue: 1=1,0; 2= 0,5; 3= 0,25 e 4= 0,0. Desta forma foi possível calcular o índice de atividade citoquímica (IAC), multiplicando o número de espermatozóides registrados em cada uma das classes pelo seu escore relativo.

$IAC = \text{escore total} / \text{número de espermatozóides classificados} \times 100$

Experimento 2:

Inseminação Artificial dos Animais

A etapa de campo foi conduzida durante uma estação de monta (EM) de 35 dias (novembro a dezembro de 2005), na Fazenda Nossa Senhora da Muxima, localizada no município de Água Clara, região leste do estado de Mato Grosso do Sul – Brasil. Foram inseminadas, com única inseminação, 300 novilhas da raça Nelore com 24 a 28 meses de idade, sendo 30 inseminações por tratamento para cada touro. Todos os animais foram manejados sob pastejo rotacionado em *Brachiaria brizantha* com sal mineral e água *ad libitum*. A detecção do estro foi realizada duas vezes ao dia (manhã e tarde), com auxílio de rufiões com buçal marcador na proporção de 3% em relação ao total de matrizes. A inseminação artificial foi realizada 12 horas após a detecção do estro, sendo a descongelação realizada submergindo as palhetas em banho-maria a 35°C por vinte segundos. O diagnóstico de gestação foi realizado 60 dias após a inseminação por meio de palpação via trans-retal.

Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada empregando-se o sistema SAS (Statistical Analysis System), versão, 9.1.

Para a variável vigor espermático foi utilizada a estatística descritiva (média, desvio padrão e amplitude).

Para as variáveis com dados em porcentagem utilizou-se da transformação de arco seno da raiz da porcentagem.

Seguindo um modelo inteiramente casualizado tendo nas parcelas um fatorial 2x5 (dois diluidores e cinco touros), as variáveis quantitativas foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, à 5% de significância.

Utilizou-se o desdobramento do fator touro confrontando touros com melhor ou pior qualidade de sêmen.

Para os dados de inseminação artificial, as frequências foram analisadas pelo teste de qui-quadrado para independência, com 5% de probabilidade de erro.

A correlação de Pearson foi testada nas variáveis para verificar possíveis relações entre as características estudadas.

Resultados

Características físicas e morfológicas do sêmen *in natura*

Na Tabela 1 encontram-se os valores médios e desvios padrão das características de volume, concentração, turbilhonamento, motilidade espermática progressiva retilínea, vigor espermático, volume de diluidor adicionado, volume de Trolox adicionado no sêmen *in natura*.

TABELA 1: Características físicas e volume adicionado de diluidor controle e Trolox no sêmen *in natura* de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.

VARIÁVEL	Touro 1	Touro 2	Touro 3	Touro 4	Touro 5
VOL (mL)	1,04±0,14 ^b	1,12±0,36 ^{ab}	1,12±0,22 ^{ab}	1,27±0,43 ^a	1,04±0,14 ^b
CONC (x10 ⁹)	1,33±215,88 ^{bc}	1,51±383,47 ^b	1,74±373,22 ^a	1,26±280,29 ^c	1,50±377,45 ^b
TURB (0-5)	4,17±0,58 ^a	4,33±0,81 ^a	4,08±0,79 ^a	3,92±1,20 ^a	4,62±0,48 ^a
MOT (0-100)	70,69±7,38 ^b	78,61±9,53 ^a	72,36±5,14 ^b	82,05±3,57 ^a	80,42±4,84 ^a
VIG (0-5)	4,07±0,40 ^b	4,53±0,57 ^a	4,19±0,54 ^b	4,73±0,43 ^a	4,67±0,32 ^a
VOLAD (mL)	11,04±2,02 ^{bc}	13,34±3,18 ^{ab}	14,57±3,41 ^a	10,08±2,56 ^c	12,53±3,42 ^{ab}
TROLOX (µL)	280,27±77,5 ^{bc}	347,58±92,1 ^b	358,60±67,5 ^a	258,40±47,3 ^c	301,62±77,7 ^b

VOL = volume do ejaculado; CONC/10⁹ = concentração espermática em mL de ejaculado em milhões; TURB = turbilhonamento; MOT = motilidade espermática progressiva retilínea; VIG = vigor espermático; VOLAD = volume de diluidor adicionado; TROLOX = volume de Trolox adicionado. Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Para a variável volume foi mensurado o volume disponibilizado para o experimento e não o volume do ejaculado e o volume médio foi de 1,12 mL, e a concentração espermática média foi de 1,47 x 10⁹ espermatozoides/mL, havendo variação entre os ejaculados dos touros ($p < 0,05$). Os valores médios de turbilhonamento não apresentaram variação ($p > 0,05$) entre touros, porém a motilidade e vigor espermático diferiram ($p < 0,05$), sendo os touros 2, 4 e 5 melhores que os touros 1 e 3 (Figura 1).

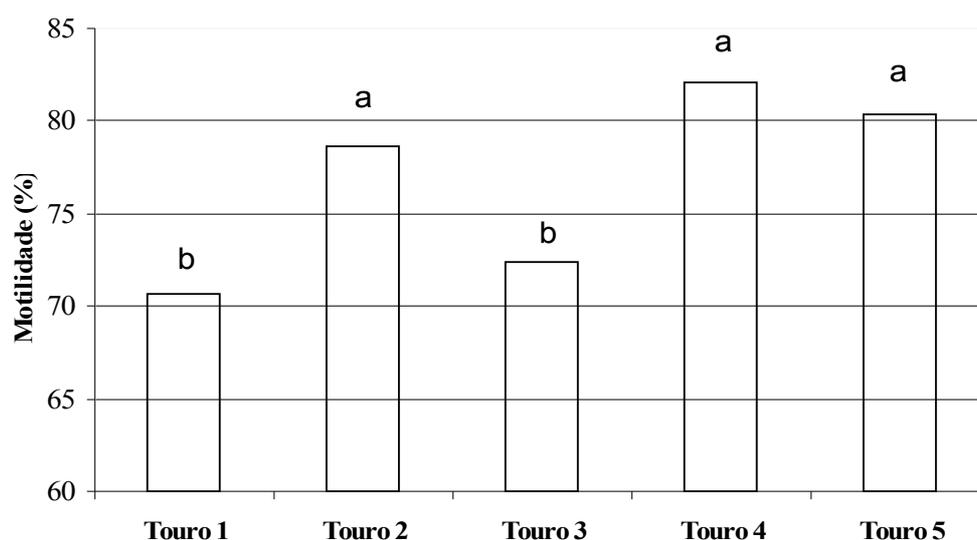


FIGURA 3. Valores médios da motilidade espermática progressiva retilínea no sêmen *in natura* coletado de cinco touros Nelore, mantidos em regime de coletas em Central de Inseminação. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey.

Na Tabela 2, encontram-se os valores médios e desvios padrão das características morfológicas do sêmen (defeito maior, defeito menor e defeito espermático total). A porcentagem de espermatozóides normais diferiu ($p < 0,05$) entre touros mostrando que os touros 5 (91,25%), 4 (88,89%) e 2 (84,13%) são melhores que os touros 3 (78,08%) e 1 (58,04%). Patologia dentro dos padrões aceitáveis para congelamento.

TABELA 2: Características morfológicas do sêmen *in natura* de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.

FATOR	VARIÁVEL		
	DMA (%)	DME (%)	DT (%)
Touro 1	33,44±9,61 ^d	8,51±7,52 ^b	41,96±11,44 ^d
Touro 3	19,17±7,31 ^c	2,75±2,66 ^a	21,92±7,99 ^c
Touro 2	10,66±5,16 ^b	5,21±5,52 ^a	15,87±9,58 ^b
Touro 4	7,19±2,61 ^{ab}	3,80±4,20 ^a	11,11±5,64 ^{ab}
Touro 5	5,12±1,69 ^a	3,58±1,86 ^a	8,71±2,55 ^a

DMA = defeito espermático maior; DME = defeito espermático menor; DT = defeito espermático total. Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p > 0,05$), pelo Teste de Tukey.

EXPERIMENTO 1: TESTES COMPLEMENTARES

Testes Hiposmótico e Fluorescência para sêmen diluído e congelado/descongelado

A porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, avaliados pelos testes hiposmótico e fluorescência, não diferiu antes do processo de criopreservação, entre Dil C (64,88 ± 13,71) (40,86 ± 14,26) e Dil T (67,19 ± 11,40) (38,30 ± 11,42), respectivamente. Porém, diferiu ($p < 0,05$) entre touros (Tabela 3).

TABELA 3: Percentual médio ± desvio padrão dos parâmetros espermáticos relativos à integridade das membranas plasmáticas, avaliados pelos testes hiposmótico e de fluorescência no sêmen de touros da raça Nelore, diluído e não congelado no Dil C e Dil T, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.

FATOR	VARIÁVEL	
	HIPO (%)	FLUO (%)
Dil C	64,88±13,71 ^a	40,86±14,26 ^a
Dil T	67,19±11,40 ^a	38,30±11,42 ^a
Touro 1	54,43±13,65 ^b	38,08±7,98 ^{bc}
Touro 2	64,43±15,12 ^a	31,40±10,47 ^c
Touro 3	53,47±13,09 ^b	46,77±9,24 ^a
Touro 4	71,78±9,67 ^a	44,85±7,99 ^{ab}
Touro 5	65,82±13,67 ^a	36,37±13,86 ^c

Dil C = diluidor controle (Tris), Dil T = diluidor Trolox (Tris + Trolox), HIPO = percentual de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico; FLUO = percentual de espermatozóides com membrana plasmática íntegra. Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p > 0,05$), pelo Teste de Tukey.

Na Tabela 4, a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, avaliados pelos testes hiposmótico e integridade de membrana, também não diferiu após o processo de criopreservação, entre Dil C ($48,51 \pm 10,63$) ($40,72 \pm 8,79$) e Dil T ($51,52 \pm 10,51$) ($42,44 \pm 7,21$), respectivamente. Porém, diferiu ($p < 0,05$) entre touros para ambos os testes (Figura 4, Tabela 5).

Foi verificada uma queda de 25,23% e 23,32% no número de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico com o processo de congelação, respectivamente, para o Dil C e Dil T.

TABELA 4: Percentual médios \pm desvios padrão dos parâmetros espermáticos relativos à integridade das membranas plasmáticas, avaliados pelos testes hiposmótico e de fluorescência no sêmen pré e pós congelação com Dil C e Dil T de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.

FATOR	PRÉ-CONGELAÇÃO		PÓS-CONGELAÇÃO	
	HIPO (%)	FLUO (%)	HIPO (%)	FLUO (%)
Dil C	64,88 \pm 13,71 ^a	40,86 \pm 14,26 ^a	48,51 \pm 10,63 ^a	40,72 \pm 8,79 ^a
Dil T	67,19 \pm 11,40 ^a	38,30 \pm 11,42 ^a	51,52 \pm 10,51 ^a	42,44 \pm 7,21 ^a
Touro 1	54,43 \pm 13,65 ^b	38,08 \pm 7,98 ^{bc}	42,50 \pm 12,12 ^c	34,94 \pm 5,99 ^c
Touro 2	64,43 \pm 15,12 ^a	31,40 \pm 10,47 ^c	48,92 \pm 8,75 ^{bc}	44,25 \pm 8,12 ^{ab}
Touro 3	53,47 \pm 13,09 ^b	46,77 \pm 9,24 ^a	45,58 \pm 7,11 ^c	42,25 \pm 6,02 ^{ab}
Touro 4	71,78 \pm 9,67 ^a	44,85 \pm 7,99 ^{ab}	59,23 \pm 6,73 ^a	46,21 \pm 6,60 ^a
Touro 5	65,82 \pm 13,67 ^a	36,37 \pm 13,86 ^c	53,23 \pm 9,10 ^{ab}	39,64 \pm 8,70 ^{bc}

Dil C= diluidor controle (Tris), Dil T= diluidor Trolox (Tris+ Trolox), HIPO = percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico; FLUO = percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey.

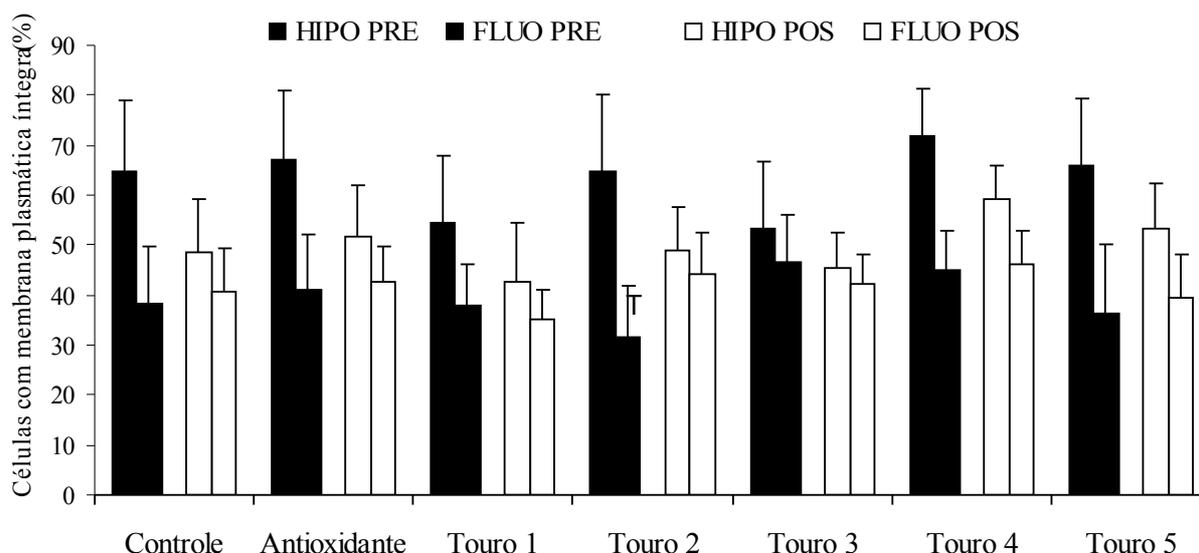


FIGURA 4. Valores médios obtidos nos teste hiposmótico e de fluorescência para células com membrana plasmática íntegra, em sêmen pré e pós congelação com diluidor controle e diluidor com antioxidante de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coletas em Central de Inseminação.

TABELA 5: Percentual médio dos parâmetros espermáticos relativos à integridade das membranas plasmáticas, avaliados pelos testes hiposmótico e de fluorescência no sêmen pós congelação com Dil C e Dil T, e contrastados quanto a qualidade espermática, de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.

FATOR	HIPO (%)		FLUO (%)	
	Dil C	Dil T	Dil C	Dil T
Touro 2	48,42	49,42	45,96	42,54
Touro 4	58,12	61,87	45,96	46,08
Touro 5	51,95	54,95	37,83	41,80
TN (média)	52,83^a	55,41^a	43,25^a	43,47^a
Touro 1	40,17	44,83	32,83	37,04
Touro 3	44,75	46,42	40,67	40,50
TP (média)	42,46^b	45,62^b	36,75^b	38,77^b

Dil C= diluidor controle (Tris), Dil T= diluidor Trolox (Tris+ Trolox), TN = touros normais, TP = touros com patologia morfológica aumentada, HIPO = percentual de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico; FLUO = percentual de espermatozóides com membrana plasmática íntegra. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey.

Teste de termo-resistência lento em sêmen pós-congelação

Os valores médios da motilidade progressiva retilínea e vigor espermático pós-descongelação avaliados pelo teste de termo-resistência lento estão demonstrados na Tabela 6. Os valores apresentados na Tabela 6 indicam não ter ocorrido diferença ($p > 0,05$) da motilidade espermática progressiva retilínea entre Dil C e Dil T, porém houve diferença ($p < 0,05$) entre touros (Fig.3 e Tab.6).

TABELA 6: Percentual médios \pm desvios padrão da motilidade espermática progressiva retilínea no teste de termo-resistência lento (TTR) do sêmen pós descongelação com Dil C e Dil T, de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.

FATOR	TTR (min)			
	0	60	120	180
Dil C	51,97 \pm 7,81 ^a	49,84 \pm 11,76 ^a	42,13 \pm 15,56 ^a	34,51 \pm 18,72 ^a
Dil T	52,29 \pm 8,27 ^a	49,91 \pm 12,05 ^a	42,37 \pm 15,38 ^a	34,32 \pm 18,79 ^a
Touro 1	42,92 \pm 6,58 ^c	36,66 \pm 14,27 ^c	23,96 \pm 12,42 ^c	14,58 \pm 12,33 ^b
Touro 2	56,25 \pm 4,72 ^a	55,62 \pm 4,73 ^a	51,87 \pm 8,82 ^a	46,46 \pm 11,47 ^a
Touro 3	48,12 \pm 6,22 ^b	45,21 \pm 10,98 ^b	34,17 \pm 13,73 ^b	23,75 \pm 18,01 ^b
Touro 4	58,08 \pm 5,67 ^a	57,11 \pm 5,69 ^a	51,73 \pm 9,79 ^a	45,77 \pm 13,24 ^a
Touro 5	55,00 \pm 4,38 ^a	54,50 \pm 5,32 ^a	49,32 \pm 6,60 ^a	41,14 \pm 12,24 ^a

Dil C= diluidor controle (Tris), Dil T= diluidor Trolox (Tris+ Trolox), Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey.

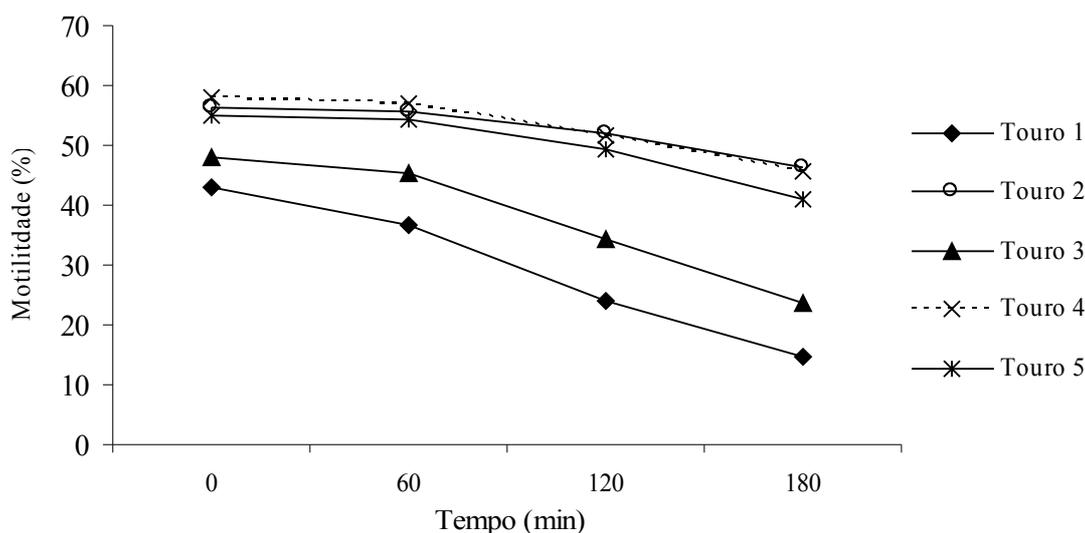


FIGURA 5. Valores médios da motilidade espermática progressiva retilínea, obtidos pelo TTR lento, no sêmen pós-congelação de cinco touros da raça Nelore, mantidos em regime de coletas em Central de Inseminação; destacando os touros 2, 4 e 5 como os melhores.

TABELA 7: Percentual médios \pm desvios padrão do vigor espermático (0-5) no teste de termo-resistência lento (TTR) do sêmen pós descongelação com Dil C e Dil T, de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.

FATOR	TTR (min)			
	0	60	120	180
Dil C	3,00 \pm 0,00 ^a	2,95 \pm 0,22 ^a	2,89 \pm 0,38 ^a	2,70 \pm 0,78 ^a
Dil T	3,00 \pm 0,00 ^a	2,95 \pm 0,22 ^a	2,90 \pm 0,36 ^a	2,73 \pm 0,64 ^a
Touro 1	3,00 \pm 0,00 ^a	2,83 \pm 0,38 ^a	2,67 \pm 0,64 ^b	2,21 \pm 0,98 ^b
Touro 2	3,00 \pm 0,00 ^a	3,00 \pm 0,00 ^a	3,00 \pm 0,00 ^a	2,96 \pm 0,20 ^a
Touro 3	3,00 \pm 0,00 ^a	2,92 \pm 0,28 ^a	2,81 \pm 0,44 ^{ab}	2,42 \pm 1,02 ^b
Touro 4	3,00 \pm 0,00 ^a	3,00 \pm 0,00 ^a	3,00 \pm 0,00 ^a	3,00 \pm 0,00 ^a
Touro 5	3,00 \pm 0,00 ^a	3,00 \pm 0,00 ^a	3,00 \pm 0,00 ^a	3,00 \pm 0,00 ^a

Dil C= diluidor controle (Tris), Dil T= diluidor Trolox (Tris+ Trolox), Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey.

Os valores apresentados na tabela 7 indicam não ter ocorrido diferença ($p > 0,05$) do vigor espermático entre Dil C e Dil T, porém houve diferença ($p < 0,05$) entre touros a partir de 120 minutos, sendo os touros 2, 4 e 5 os melhores.

Teste de atividade citoquímica (Coloração DAB)

Os valores apresentados na Tabela 7 indicam não ter ocorrido diferença ($p > 0,05$) da atividade mitocondrial entre Dil C e Dil T, porém houve diferença ($p < 0,05$) entre touros para as classes de mitocôndria ativa (MA) e mitocôndria pouco ativa (MPA) (Figura 4 e 5).

TABELA 8: Percentual médio da atividade citoquímica das mitocôndrias, observadas pelo teste de coloração DAB, em sêmen pós-descongelamento com Dil C e Dil T, de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação.

FATOR	MMA		MA		MPA		MI	
	SPTZ (%)	IAC (%)	SPTZ (%)	IAC (%)	SPTZ (%)	IAC (%)	SPTZ (%)	IAC (%)
Dil C	69,22	69,22	13,76 ^a	6,87	8,42 ^a	2,10	8,64	0,00
Dil T	68,70	68,70	14,44 ^a	7,22	8,06 ^a	2,01	8,84	0,00
Touro 1	71,31	71,31	8,31 ^c	4,16	7,62 ^{ab}	1,91	12,69	0,00
Touro 2	61,95	61,95	20,04 ^a	10,02	11,40 ^a	2,85	6,70	0,00
Touro 3	68,44	68,44	13,37 ^{bc}	6,69	8,69 ^{ab}	2,17	9,50	0,00
Touro 4	71,21	71,21	15,37 ^{ab}	7,69	6,21 ^b	1,55	7,46	0,00
Touro 5	71,33	71,33	12,21 ^{bc}	6,10	7,75 ^{ab}	1,94	8,58	0,00

Dil C= diluidor controle (Tris), Dil T= diluidor Trolox (Tris+ Trolox), MMA= mitocôndrias muito ativas, MA= mitocôndrias ativas, MPA= mitocôndrias pouco ativas, MI= mitocôndrias inativas, IAC = índice de atividade citoquímica, SPTZ= % de espermatozóides. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey.

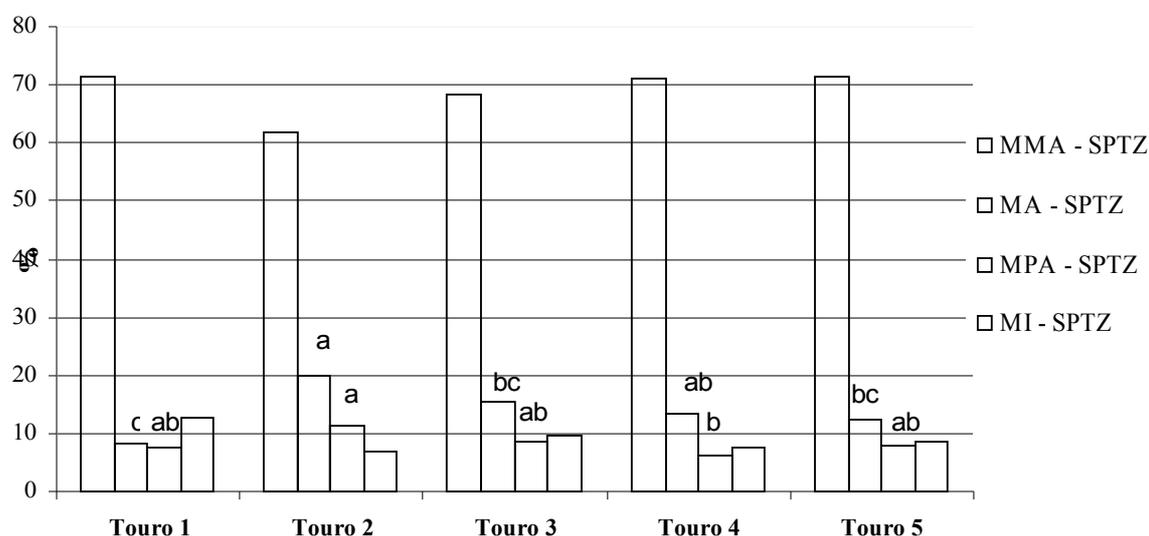


FIGURA 6. Valores médios da atividade citoquímica das mitocôndrias, observadas pelo teste de coloração DAB, em sêmen pós-descongelamento com Dil C e Dil T, de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação. Médias seguidas de letras diferentes para mesma categoria diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

EXPERIMENTO 2: TESTE *IN VIVO*

Inseminação artificial

Os valores apresentados na Tabela 9 indicam que o tratamento com antioxidante não influenciou ($P > 0,05$) na taxa de prenhez quando comparados os cinco touros, porém, ao dividir os animais em duas categorias (TP= touros com elevada patologia espermática e TN= touros normais) em relação à porcentagem de defeitos morfológicos espermáticos, observou-se que eles responderam diferentemente ao tratamento com o diluidor contendo antioxidante, ou seja,

animais que apresentavam maior porcentagem de patologia espermática responderam positivamente ao tratamento com antioxidante ($P<0,05$). No touro 1 e no touro 3, o Dil T, foi melhor que o Dil C (Fig.6).

TABELA 9: Número de prenhez, taxa de prenhez e número total de inseminações de acordo com o Dil C e Dil T, por touro.

Touros	Diluidor Controle (Dil C)			Diluidor Trolox (Dil T)			Defeitos Espermáticos Totais
	Prenhez (n)	Prenhez (%)	Total IA (n)	Prenhez (n)	Prenhez (%)	Total IA (n)	DT (%)
5	23	76,7	30	18	60,0	30	8,0
2	20	66,7	30	17	56,7	30	13,5
4	19	63,3	30	16	53,3	30	14,5
3	15	50,0	30	18	60,0	30	19,0
1	11	36,7	30	18	60,0	30	22,0
Total	88	58,7^a	150	87	58,0^a	150	15,4

IA=Inseminação Artificial ($p>0,05$) pelo teste de qui-quadrado.

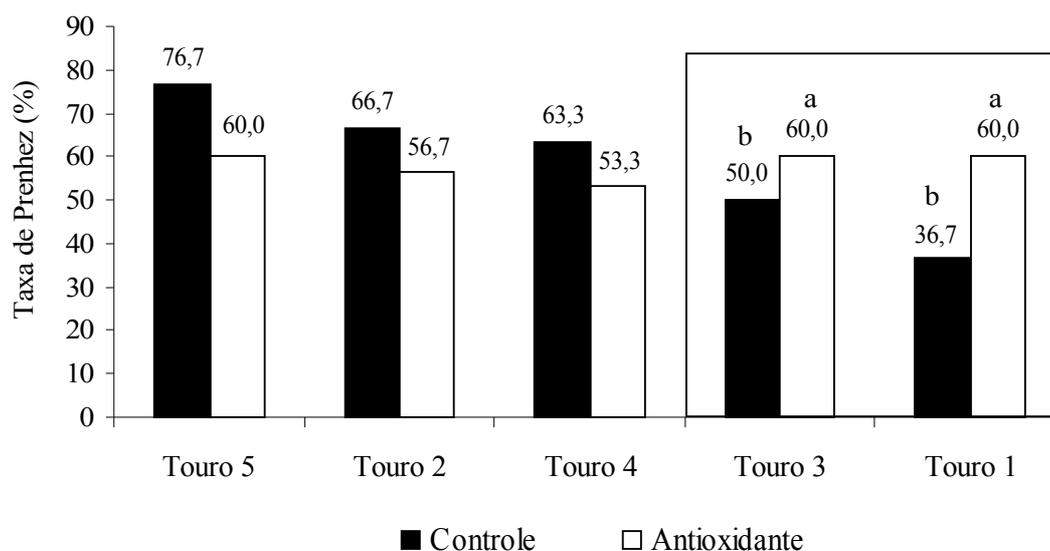


FIGURA 7. Porcentagem de novilhas gestantes em relação ao Dil C e Dil T para touros da raça Nelore. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p<0,06$), pelo Teste de Qui-quadrado quando comparados os diluidores para os touros 1 e 3.

Discussão

Espécies reativas de oxigênio possuem importante função no processo fisiológico espermático, como na hiperativação e fusão com o oócito (DE LAMIRANDE e GANON, 1993), porém, quando em excesso, causam defeitos celulares frequentemente irreversíveis (AGARWAL et al., 2003 e 2005, CHENOWETH, 2005, SAID et al., 2005).

O objetivo de utilizar o Trolox neste experimento foi obter um antioxidante similar à vitamina E, porém solúvel em água (BARCLAY et al., 1995, ALBERTINI e ABUJA, 1999), com a finalidade de facilitar a manipulação do diluidor, sendo que em estudos prévios (dados não publicados) utilizou-se o acetato de α -tocoferol, o qual tinha que ser emulsificado previamente, para depois ser homogeneizado com o diluidor. Vários estudos adicionaram antioxidante ao diluidor para manter a integridade da membrana plasmática por diminuir e/ou neutralizar a produção de radicais livres originados pelo próprio metabolismo celular (KOCA et al., 2003) e pelo processo de congelação/descongelação (BECONI et al., 1993, BILODEAU et al., 2000 e 2001, ANZAR et al., 2002). O efeito do antioxidante na qualidade seminal foi analisado pela motilidade espermática e pela análise da integridade da membrana plasmática (BAUMBER et al., 2000, BALL et al., 2001, BILODEAU et al., 2002, MERKIES et al., 2003), características estas, que possuem boa estimativa da capacidade fecundante, embora não sejam parâmetros ideais, como é a taxa de prenhez, obtida pela inseminação artificial. Assim, o estudo foi conduzido com a finalidade de demonstrar uma resposta definitiva da eficiência do antioxidante, com testes *in vitro* e *in vivo*. A motilidade e vigor espermáticos são características tradicionais para prever a qualidade do sêmen a campo, porém STALHAMMAR et al (1994) ressaltaram que existem limitações com esse simples critério de análise do sêmen bovino. Para BARTH e OKO (1987) a qualidade espermática deveria ser determinada pelo estudo da morfologia espermática refletindo a saúde dos túbulos seminíferos, epidídimo e glândulas anexas. Corroborando com esses autores, verificou-se no presente estudo, que touros que apresentaram menor motilidade e vigor espermáticos e grande porcentagem de patologias espermáticas foram aqueles que apresentaram menores taxas de prenhez com ambos diluidores (com e sem antioxidante).

Os touros foram escolhidos ao acaso e os defeitos morfológicos de todas as doses usadas na inseminação artificial estavam nos padrões aceitáveis para congelação (i.e. defeitos totais abaixo de 30%), mas diferenças foram observadas entre touros, e dois deles apresentaram pobre qualidade seminal durante o experimento, ou seja, nas outras coletas que não foram utilizadas para IA. Embora não fosse objetivo observar a qualidade espermática dos touros, este fator (qualidade espermática por touro) esteve evidente, ao ponto dos animais serem separados em dois grupos: três touros normais e dois touros patológicos (baixa qualidade seminal), então se

realizou a análise para contrastá-los. No presente trabalho, observou-se diferença ($p < 0,0001$) para o contraste entre touros normais e com patologia seminal. Outros estudos também demonstraram a importância do fator individual sobre características observadas (DEN DAAS et al., 1998, SAACKE et al., 2000).

Não se verificou nenhuma diferença na motilidade e vigor espermáticos entre os diluidores (com e sem antioxidante) antes da congelação e depois do teste de termo resistência após a descongelação. Esses resultados estão de acordo com AURICH et al. (1997), UPRETI et al. (1998) e BALL et al. (2001) que trabalharam com antioxidante no diluidor a base de leite para a congelação de sêmen de garanhão, ovinos e garanhão, respectivamente. PENÃ (2003), observou no sêmen de suíno, um aumento progressivo na velocidade espermática e movimento individual e redução de espermatozoides apresentando movimentos circulares ($p < 0,05$) com a utilização de $100\mu\text{M}$ e $200\mu\text{M}$ Trolox e AGUERO et al. (1995) no sêmen de equino com a utilização da vitamina E.

As mitocôndrias são responsáveis pela energia que dá motilidade aos espermatozoides e são também um dos principais lugares de produção de ROS, junto com a membrana plasmática. Espermatozoides produzem ROS principalmente quando ocorre um defeito durante a espermatogênese resultando na retenção da gota citoplasmática (ZINI et al, 1993, SAWYER et al., 2001, BENNETTS e AITKEN, 2005). Por isso, há forte e positiva correlação entre espermatozoides imaturos e produção de ROS que afetam negativamente a qualidade espermática (HENKEL et al., 2003, MOUSTAFA et al., 2004, SAID et al, 2004, AGARWAL et al, 2003 e 2005) e, conseqüentemente, a taxa de prenhez (LEWIS e AITKEN, 2005, ERENPREISS et al., 2006).

Efeito desfavorável sobre a qualidade espermática foi verificado pelas correlações negativas entre motilidade espermática e defeitos espermáticos totais ($r = -0,57$), e entre integridade da membrana plasmática (pelo teste hiposmótico) e os defeitos espermáticos totais ($r = -0,45$). A correlação positiva entre motilidade espermática e integridade da membrana plasmática ($r = 0,49$) respalda as associações das características relacionadas à qualidade seminal e conseqüentemente a fertilidade.

Não houve diferença entre diluidores (com e sem antioxidante) para integridade da membrana plasmática avaliada pelos testes hiposmótico e fluorescência, porém, novamente observou-se diferença para tais testes quando se comparou touros normais e touros com patologia espermática ($p < 0,01$). Pelo teste hiposmótico, o número de espermatozoides reativos, ou seja, com membrana plasmática íntegra, diminuiu 25,23% e 23,32%, com o processo de criopreservação, respectivamente, para o diluidor controle e o com antioxidante. Acredita-se que esta menor diminuição do diluidor com antioxidante e para touros com morfologia espermática

elevada foi devido ao efeito de proteção do antioxidante, embora sem diferença significativa ($p>0,05$).

A correlação entre células espermáticas reativas obtidas no teste hiposmótico e motilidade espermática foi positiva antes e após o processo de criopreservação ($r=0,48$ e $r=0,49$), respectivamente.

Os valores foram semelhantes entre espermatozóides com membranas reativas, pelo testes hiposmótico, e a percentagem de células móveis após a descongelação, respectivamente, ($48,51\pm 10,63$ vs. $51,97\pm 7,81$) para o diluidor controle e ($51,52\pm 10,51$ vs. $52,29\pm 8,27$) para o diluidor com antioxidante, indicando eficiência do teste neste experimento. No entanto, o mesmo não ocorreu para o teste de integridade da membrana plasmática por fluorescência e motilidade espermática após a descongelação, respectivamente, ($40,72\pm 8,79$ vs. $51,97\pm 7,81$) para o diluidor controle e ($42,44\pm 7,21$ vs. $52,29\pm 8,27$) para o diluidor com antioxidante. Esses resultados questionam a acurácia dos testes complementares *in vitro*, sendo que vários autores (BALLACHEY et al., 1988, SIKKA, 1996, CHENOWETH, 2005) enfatizaram que prever a capacidade fecundante das amostras de sêmen pode não ser precisa quando analisadas por um único teste *in vitro*. Porém, quando métodos *in vitro* são utilizados em conjunto aumenta-se a acurácia de predição do potencial de fertilidade do sêmen congelado/descongelado.

O teste de atividade citoquímica também não diferiu entre diluidores (com e sem antioxidante), porém diferiu entre touros ($p<0,05$), e touros com elevada patologia espermática apresentaram menor atividade citoquímica, um fato que pode ser explicado pela presença em menor quantidade de células viáveis.

A taxa de prenhez não diferiu entre diluidores, mas o contraste entre touros (com elevada patologia espermática e touros normais) mostraram que o diluidor com antioxidante foi significativamente ($p<0,06$) melhor do que o diluidor controle.

Embora a motilidade espermática não tenha melhorado, outros estudos tem reportado a eficiência do antioxidante, mesmo que nenhum deles tenha testado a eficiência *in vivo*. Na reprodução humana, o antioxidante é amplamente utilizado no tratamento de homens inférteis, principalmente pela administração oral (KESKES-AMMAR et al., 2003, GRECO et al., 2005) e inúmeras vantagens foram observadas, como a melhora da qualidade espermática e aumento da produção *in vitro* de embriões.

Não há dúvida que o antioxidante protege a membrana plasmática dos espermatozóides contra os efeitos deletérios dos radicais livres, porém ainda não se conhece qual o melhor antioxidante a ser utilizado e qual a melhor quantidade a ser administrada para que não se torne pró-oxidante, o que pode ter ocorrido neste experimento com o diluidor com antioxidante utilizado nos touros com qualidade espermática normal. Por isso, conhecer os componentes

bioquímicos das células espermáticas e do plasma seminal e entender as variações individuais são fatores fundamentais a serem pesquisados.

Conclusões

O presente trabalho permite concluir que:

1)Comparando todos os touros

1.1. O diluidor contendo antioxidante não melhorou a motilidade espermática, a integridade da membrana plasmática, pelos testes de fluorescência e hiposmótico e a atividade citoquímica das células espermáticas.

1.2. Não melhorou a viabilidade dos espermatozoides por não aumentar a taxa de prenhez.

2)Comparando touros com elevada patologia espermática versus touros com qualidade espermática normal

2.1. O diluidor contendo antioxidante não melhorou a motilidade espermática, a integridade da membrana plasmática e a atividade citoquímica das células espermáticas avaliadas pelos testes complementares.

2.2. A utilização de antioxidante aumentou a taxa de prenhez de touros com elevada patologia espermática e menor sobrevivência no teste de termo resistência.

CAPÍTULO 3 - EFEITO DO SÊMEN BOVINO CRIOPRESERVADO COM ANTIOXIDANTE SOBRE OS MÉTODOS DE SELEÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES (LAVAGEM X PERCOLL) NAS TAXAS DE CLIVAGEM, BLASTOCISTO E APOPTOSE DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*

Título

Efeito do Sêmen Bovino Criopreservado com Antioxidante sobre os Métodos de Seleção de Espermatozóides (Lavagem X Percoll) nas Taxas de Clivagem, Blastocisto e Apoptose de Embriões Produzidos *in vitro*

Resumo

O preparo dos espermatozóides bovinos para a fecundação *in vitro* (FIV) usualmente envolve procedimentos para separar os espermatozóides do plasma seminal, diluidor e/ou crioprotetores. Entretanto, existem divergências em relação aos resultados obtidos com o uso destes métodos. Com objetivo de comparar duas técnicas de separação dos espermatozóides com diluidor contendo antioxidante, oócitos com citoplasma homogêneo e *Cumulus oophorus* compacto, obtidos de ovários de vacas de abatedouro foram selecionados e maturados, por 24 horas, em grupos de 25 oócitos para gotas de 100µL de meio TCM 199 suplementado com 10% de SFB, 1µg/mL de FSH, 100 UI/mL de hCG e 1µg/mL de estradiol, 0,25mM piruvato de sódio e 75µg/mL amicacina., sob óleo mineral, em estufa a 38,5°C e atmosfera a 5% CO₂ em ar. Os oócitos maturados foram colocados em gotas de meio de FIV (TALP + BSA, PHE e 10µg/mL de heparina) com 1x10⁶ espermatozóides móveis por mL. Para cada FIV, três repetições por touro, duas doses de sêmen do mesmo touro e mesma partida, foram descongeladas (35°C por 20 segundos) e cada dose foi processada por um método de separação de espermatozóides para obtenção do sedimento: ML (duas centrifugações por 5 minutos a 36g com 2mL de TL-sêmen) e GP (Percoll 45 e 90% centrifugado por 30 minutos a 500g). Após 22 a 24 horas, procedeu-se o desnudamento dos zigotos e o cultivo foi efetuado em microgotas de meio SOF suplementado com 2,5% SFB e 0,5% BSA, em estufa de 5% CO₂ em ar, a 38,5°C, durante 7 a 9 dias. As taxas de clivagem após 36 hpi, e produção de blastocistos no dia 7 e dia 9 não diferiram (p>0,05) entre os métodos de separação dos espermatozóides (lavagem x Percoll) e diluidores (Controle x Trolox). Em valores absolutos, o diluidor Trolox, tanto para o método de lavagem como para o gradiente de Percoll, apresentaram média superior quando comparados com o diluidor controle (32,2 x 36,9) (30,6 x 32,7), respectivamente. Houve interação de touro com método de separação espermática (p<0,05). A produção de blastocistos diferiu (p<0,05) entre touros, sendo o melhor o touro 5 (38,55%) e o pior o touro 1 (22,61%) para ambos os métodos de separação espermática.

Entretanto, o touro 5 foi o que apresentou maior número de células apoptóticas e o touro 3 o menor. O número de células em apoptose observadas em relação ao método de separação espermática foi menor quando se utilizou o diluidor Trolox, sendo que o diluidor Trolox com o método de lavagem diferiu ($p < 0,05$) do método de lavagem com diluidor controle e do método de gradiente de densidade descontínuo de Percoll com diluidor como sem antioxidante.

Palavras – Chave: Antioxidante, Apoptose, Diluidores, Fecundação *in vitro*, Método de separação espermática, Sêmen, Touro

Abstract

Detrimental effects of oxygen-derived free radicals on the semen during cryopreservation and embryos during culture have been demonstrated in several species. This study was designed to determine the role of antioxidant (Trolox 200 μ M) in the cryopreserved semen extender of five Nelore bulls and sperm preparation techniques in *in vitro* fertilization (IVF) in bovine. The objective, in the first experiment, was to evaluate the protective effect of antioxidant on spermatozoa during IVF, by the blastocyst rate. The results demonstrated that antioxidant increased the rate of blastocyst when compared with the other treatment without antioxidant semen extender ($p < 0.05$). The discontinuous density gradient method (90/45%) was better than simple wash technique (34,8% $n = 3311$ vs. 31,55% $n = 3109$ $p < 0.05$) and the Percoll gradient with extender containing antioxidant produced more *in vitro* embryos than wash method with and without antioxidant (36,9% vs 32,2%, 30,6% $p < 0.05$) and than discontinuous density gradient method without antioxidant (36,9% vs. 32,7% $p < 0.05$). In the experiment 2, TUNEL assay was realized *in vitro* produced embryos cultivated for 7 days for each treatment. Sperm preparation methods with semen containing antioxidant showed lower levels DNA fragmentation than the same sperm separation methods with semen without antioxidant, besides the simple wash technique with antioxidant in the semen extender demonstrated significantly the lower percentage of DNA fragmentation. Discontinuous density gradient produced more blastocysts and the cryopreservation semen bovine with antioxidant in the extender had beneficial effects for *in vitro* produce embryo and sperm DNA integrity.

Key-Words: Antioxidant, Bull, Extenders, DNA fragmentation, *in vitro* fertilization, Semen, Sperm preparation methods

Introdução

Os efeitos deletérios dos radicais livres causam a lipoperoxidação da membrana plasmática dos gametas feminino e masculino e, também, dos embriões de mamíferos cultivados *in vitro*, sendo responsável por perdas na produção *in vitro* de embriões e diminuição de fertilidade *in vivo*. A fecundação *in vitro* ou produção de embriões *in vitro*, é uma técnica utilizada para produzir indivíduos com elevado mérito genético. Além disso, é utilizada para estudar a fisiologia dos processos de maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário, pois existe grande variação em relação à taxa de clivagem e produção de mórula e blastocisto decorrentes do sistema FIV. Essas diferenças são determinadas por vários fatores decorrentes das etapas que consiste esse sistema, entre eles, o preparo do sêmen. O processo de criopreservação causa efeitos deletérios nas células espermáticas, principalmente membrana plasmática devido à lipoperoxidação e fragmentação do DNA. Para que seja eficiente, a capacitação *in vitro* requer a seleção e recuperação de espermatozóides móveis, de forma normal, com integridade da membrana plasmática e livres de contaminantes do plasma seminal. Diversos métodos tem sido utilizados para eliminação do plasma seminal e separação da fração móvel do sêmen diluído e descongelado, sendo os comumente utilizados como a técnica do sedimento – “swim up” (PARRISH et al., 1984), separação por gradiente descontínuo de Percoll (AVERY e GREVE, 1995) e lavagem mediante centrifugação (JAAKMA, et al., 1997). Esses métodos além de melhorar a viabilidade pós-descongelamento do sêmen utilizado para FIV, também elimina o diluidor do sêmen. Entretanto, observa-se que a viabilidade pós-descongelamento ainda é significativamente afetada pelo diluidor do sêmen (ANZAR e GRAHAN, 1995), podendo interferir nos subseqüentes processos de fecundação e/ou desenvolvimento embrionário.

A adição de antioxidante no diluidor do sêmen tem o intuito de reduzir os níveis de radicais livres e, conseqüentemente, evitar a lipoperoxidação da membrana plasmática dos espermatozóides, mantendo sua viabilidade e aumentando as taxas de clivagem e de blastocisto. Além disso, esses métodos de seleção e separação dos espermatozóides também interferem na eficiência do processo (AVERY e GREVE, 1995; JAAKMA, et al., 1997; PARRISH et al., 1984), sendo o efeito individual (touro) também mencionado em vários estudos sobre a produção *in vitro* de embriões (PIV).

O presente trabalho foi conduzido com os objetivos de avaliar a utilização do diluidor contendo antioxidante na criopreservação do sêmen no desenvolvimento *in vitro* de oócitos bovinos, maturados e fecundados por dois métodos de separação do sêmen: lavagem mediante centrifugação e gradiente descontínuo de Percoll, determinando a taxa de clivagem, taxa de blastocisto e integridade do DNA dos embriões produzidos *in vitro*.

Material e Métodos

Criopreservação do Sêmen

Foram criopreservados sêmen de cinco touros da raça Nelore, sendo que metade do ejaculado foi criopreservada com diluidor controle TRIS – gema: ácido cítrico (1,5g/dL), hidroximetilaminometano – TRIS (2,42g/dL), glicose (1,25g/dL), gema de ovo (20mL/dL), penicilina (1000UI/mL), estreptomicina (1000µg/mL), glicerol (6 ml/dL) e água destilada 100mL qsp (Dil C-Tris-gema) e a outra metade com o diluidor Trolox com mesmo diluidor acrescido de 200µM de Trolox (Dil T-Tris-gema + Trolox 200µM).

Foram realizados exames, físico e morfológico, dessas amostras. E as palhetas de 0,25mL de sêmen permaneceram criopreservadas até o momento de sua utilização na produção *in vitro* de embriões. Optou-se por trabalhar com doses com elevado número de palotogia espermática, para cada touro, para verificar o efeito do antioxidante.

Coleta de oócitos e maturação in vitro

Ovários obtidos de vacas de abatedouro foram transportados ao laboratório, em solução salina a 28-32°C, e seus folículos antrais com diâmetro de 3 a 7mm foram aspirados por agulha de 18-G adaptada à seringa de 20mL. O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de 50mL o qual permaneceu por 15min dentro da estufa para decantar o sedimento e prosseguir com a seleção dos oócitos. Posteriormente, o sedimento foi transferido para placa de Petri e visualizado em microscópio estereoscópico.

Oócitos com citoplasma homogêneo e cumulus *oophorus* compacto com, no mínimo, quatro camadas de células foram selecionados e maturados *in vitro* (MIV) por 24 horas, em grupos de 25 por gota de 100µL em meio TCM 199 (GIBCO BRL, Grand Island, EUA) suplementado com 10% de SFB (Cripion, Andradina, Brasil), 1µg/mL de FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, EUA), 100 UI/mL de hCG (Profasi™, Serono, São Paulo, Brasil) e 1µg/mL de estradiol, 0,20mM piruvato de sódio e 83,4µg/mL amicacina, sob óleo mineral, em estufa a 38,5°C, com umidade saturada e atmosfera com 5% CO₂ em ar.

Experimento 1

Fecundação in vitro

Os oócitos maturados após 24h foram colocados em gotas de meio TALP- FIV (meio TALP com 10µg/mL de heparina, 18µM de penicilamina, 10µM de hipotaurina e 1,8µM de epinefrina), suplementado com piruvato (0,2mM), amicacina (83,4µg/mL) e albumina sérica bovina (BSA, 6mg/mL), cobertas com óleo mineral.

Para cada FIV (total de três repetições), quatro doses de sêmen (sendo duas para o diluidor controle e duas para o diluidor Trolox) do mesmo touro e mesma partida, foram descongeladas (35°C por 20 segundos) e cada dose foi processada por um método de separação de espermatozoides para obtenção do sedimento: método de lavagem (ML) (duas centrifugações por 5 minutos a 36g com 2mL de TL-sêmen) e Gradiente Descontínuo de Percoll (GP) (Percoll 45 e 90% centrifugado por 30 minutos a 500g em meio TALP com 10mM de hepes ácido).

Para ambos os tratamentos, ML e GP, foram recuperados 30µL do sedimento, que foram adicionados a 30µL de heparina, desse total de 60µL, 5µL foi adicionado em um microtubo contendo 250µL de meio FIV – gotas, e, 5µL em outro microtubo contendo água, para se avaliar a motilidade e concentração espermática, respectivamente. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides vivos/mL com meio TALP-FIV. Posteriormente, 4µL do sêmen diluído foram adicionados as gotas contendo os oócitos, obtendo-se concentração final de 100×10^3 espermatozoides vivos/gota.

Cultivo in vitro

Após 22 a 24 horas, procedeu-se o desnudamento dos prováveis zigotos que foram transferidos para o meio de cultivo (CIV), em microgotas de meio SOF suplementado com 2,5% SFB e 0,5% BSA, em estufa com 5% CO₂ em ar, a 38°C, onde permaneceram durante 7-9 dias. A taxa de clivagem foi observada após 36h do início do cultivo e a taxa de blastocisto foi avaliada no dia sete (D7) e no dia nove (D9).

Experimento 2:

Coloração “Terminal Transferase Assay” – TUNEL

Após 7 dias de CIV, os embriões que se encontravam em estágio de mórula, blastocisto inicial e blastocisto expandido foram selecionados para serem avaliados em porcentagem de células em apoptose utilizando a técnica de coloração “*In situ terminal deoxinucleotidyl*

transferase mediated dUTP nick end labeling assay” (TUNEL), descrita por PAULA-LOPES e HANSEN (2002).

Os embriões foram lavados em 100µL de PBS com PVP (1mg/mL) e fixados, com a zona pelúcida intacta, em 100 µL de solução de paraformaldeído (4% em PBS, pH 7,4) a temperatura ambiente, por 1h, os quais foram novamente lavados em 100 µL de PBS-PVP e armazenados sob refrigeração (4°C), para posterior processamento.

O processamento ocorreu pela permeabilização dos embriões em 200 µL de solução de Triton X-100 (0,5%, v/v) em citrato de sódio (0,1%), por 30min em temperatura ambiente, sendo em seguida, incubados os embriões reservados para controle positivo com DNase I (50 UI/mL de água Milli-Q) (RNase *free*) a 37°C por 1h, enquanto que os embriões dos tratamentos ficam em gotas de 100 µL de PBS-PVP. Todos os embriões foram lavados em 100 µL de PBS-PVP e incubados, em câmara úmida, com 15 µL da mistura (1:9, da enzima – tubo 1 e do tampão da enzima – tubo 2, respectivamente) para a coloração TUNEL (*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*, Roche Diagnostics, Germany), por 1h a 37°C na ausência de luz. Os embriões reservados para controle negativo foram incubados na ausência da enzima *terminal deoxinucleotidyl transferase* (TdT). Todos os embriões, de todos os grupos (n=675) foram incubados em 100 µL de RNase A (50 µg/mL de água Milli-Q) por 1h em temperatura ambiente, seguida por incubação com Hoechst 33342 (0,5 µg/mL de PBS-PVP) por 30 min em temperatura ambiente. Em seguida foram lavados em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1).

Os embriões foram então avaliados em microscópio de epifluorescência (excitação de 510-550 nm e emissão de 590 nm) quanto ao número de células com fragmentação de DNA (TUNEL positivas – fluorescência verde ou amarela pontual dentro do núcleo) localizadas na MCI e no TF em relação ao número total de células do blastocisto, determinado pelos núcleos corados em azul pelo Hoechst 33342.

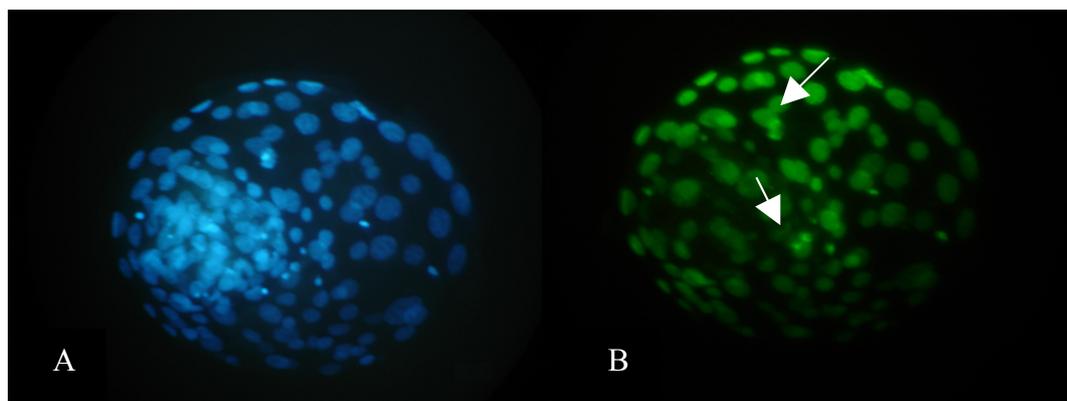


Fig 1 – Blastocistos no dia 7, corados pela técnica de coloração TUNEL, observados em microscópio de epifluorescência. A) Blastômeros corados pelo Hoechst 33342; B) Setas indicam células com fragmentação do DNA, com núcleo picnótico, em aumento de 1250 X.

Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada empregando-se o sistema SAS (Statistical Analysis System), versão, 9.1.

Para a variável vigor espermático foi utilizada a estatística descritiva (média, desvio padrão e amplitude).

Seguindo um modelo inteiramente casualizado tendo nas parcelas um fatorial 2x5 (dois diluidores e cinco touros) e nas sub-parcelas 2x2x5 (dois diluidores, dois métodos de separação do sêmen e cinco touros), as variáveis quantitativas foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey, à 5% de significância.

Para os dados de fecundação *in vitro*, as freqüências foram analisadas pelo teste de qui-quadrado para independência, com 5% de probabilidade de erro.

A correlação de Pearson foi testada entre todas as variáveis para verificar possíveis relações entre as características estudadas.

Resultados

Comparação das técnicas de preparação espermática: gradiente de densidade descontínuo de Percoll (GP) e método de lavagem por simple centrifugação (ML)

A comparação das técnicas mostrou que o GP aumentou a taxa de embriões 34,80% quando comparado com o ML 31,50% ($p < 0,05$), no entanto, não houve diferença para taxa de clivagem ($p > 0,05$) (Figura 2).

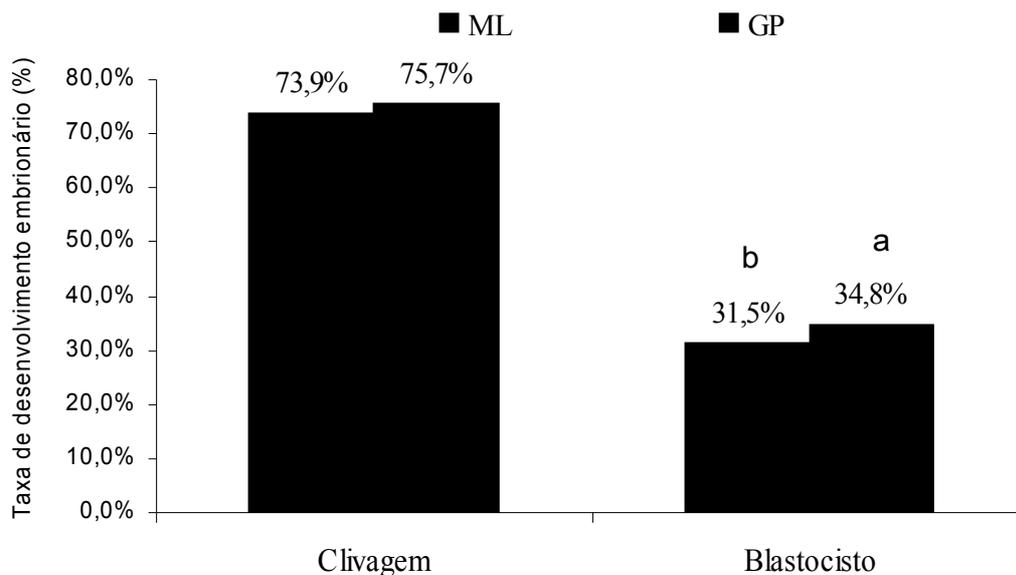


FIGURA 2. Taxa de desenvolvimento embrionário (clivagem e produção de blastocisto) pelos diferentes métodos de separação espermática (método da simples lavagem por centrifugação e gradiente de densidade descontínuo de Percoll) utilizado no sêmen congelado/descongelado de touros da raça Nelore. Médias com letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey.

Comparação do diluidor de criopreservação espermática: com e sem antioxidante

A adição do antioxidante no diluidor de sêmen para o processo de criopreservação aumentou a taxa de blastocistos (34,50%) quando comparado com o diluidor sem antioxidante (31,70%) ($p < 0,05$). A taxa de clivagem não diferiu entre valores obtidos com emprego dos diluidores Dil C e Dil T. (Figura 3)

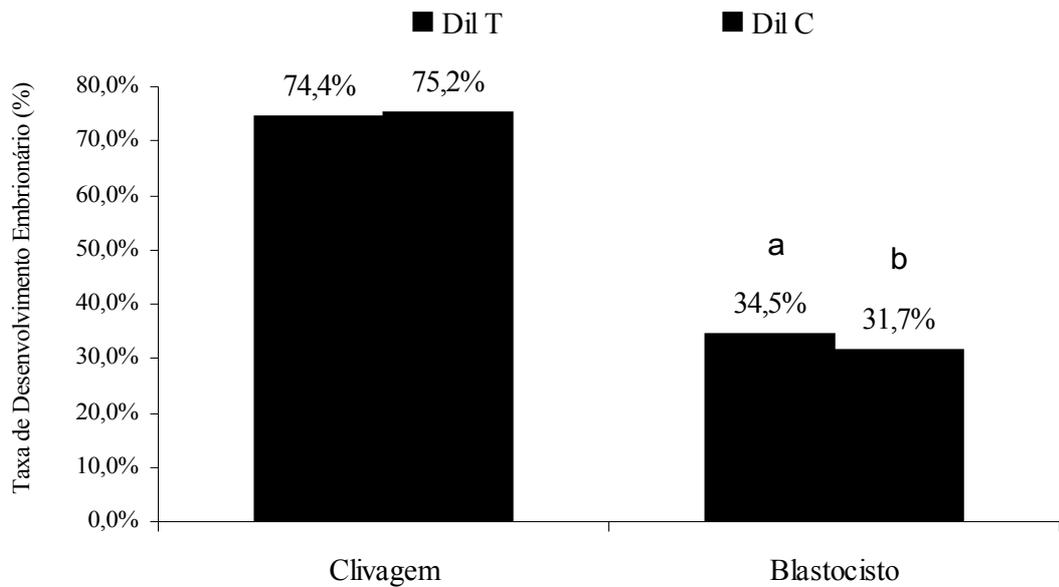


FIGURA 3. Taxa de desenvolvimento embrionário (clivagem e produção de blastocisto) por diluidores (com e sem antioxidante) utilizado no sêmen de touros Nelore. Médias com letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey.

Comparação entre tratamentos: gradiente de densidade descontínuo de Percoll e método de lavagem por simples centrifugação de sêmen criopreservado com e sem antioxidante no diluidor

Células espermáticas separadas pelo método do GP na presença do diluidor de sêmen contendo antioxidante produziram maiores taxas de blastocistos do que os demais tratamentos ($p < 0,01$). A taxa de clivagem não diferiu entre tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 1). A motilidade espermática também não diferiu ($p > 0,05$) entre métodos de separação espermática (Figura 4).

TABELA 1. Percentual de clivagem, blastocisto e apoptose e número de células (blastômeros) para cada tratamento (gradiente descontínuo de Percoll + diluidor controle, gradiente descontínuo de Percoll + diluidor antioxidante, simples lavagem por centrifugação + diluidor controle e simples lavagem por centrifugação + diluidor antioxidante).

Tratamentos	Clivagem (%) [*]	Blastocisto (%) ^{**}	N. Cels. por blastocisto [†]	Apoptose (%) ^{††}
GP+ Dil C	76.6 ^a (1210/1580)	32.7 ^b (517/1580)	81.3 ± 36.1 ^a	5.2 ± 3.6 ^b
GP + Dil T	74.8 ^a (1230/1575)	36.9 ^a (581/1575)	80.9 ± 34.1 ^a	4.7 ± 3.3 ^{ab}
ML + Dil C	73.8 ^a (1211/1641)	30.6 ^c (503/1641)	87.8 ± 35.9 ^a	5.2 ± 3.5 ^b
ML+ Dil T	74.0 ^a (1235/1669)	32.2 ^b (538/1669)	91.6 ± 33.7 ^a	3.9 ± 2.9 ^a
Valor de P	p>0,05	p<0,01	p>0,05	p<0,05

*Porcentagem de clivagem, calculada pelo número de oócitos inseminados.

**Porcentagem de blastocistos, calculado pelo número de zigotos produzidos *in vitro*.

†Média do número de células por blastocisto, calculado pelo número de blastômeros contados.

††Porcentagem de células apoptóticas, calculada pelo número de blastômeros.

^{a-c} Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (p<0,05), pelo Teste de Tukey.

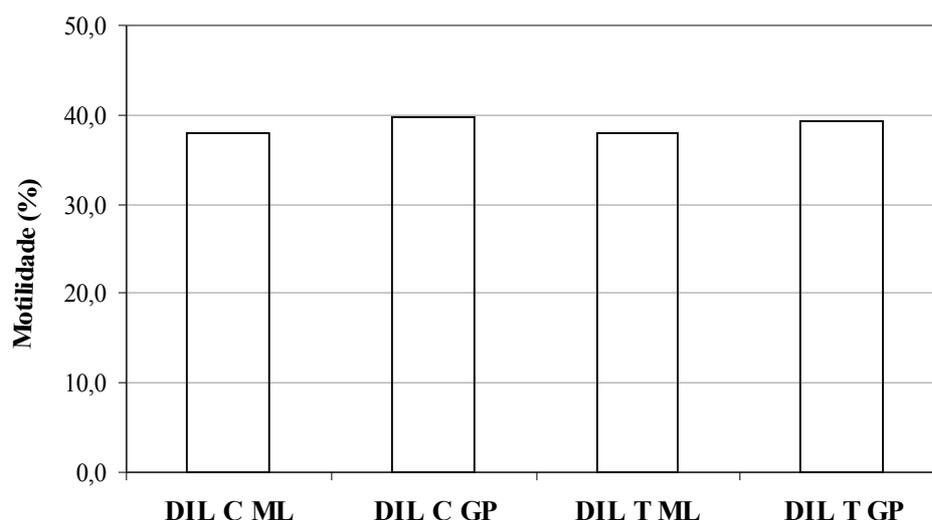


FIGURA 4. Valores médios ajustados da motilidade espermática progressiva retilínea, obtidos após diferentes métodos de separação do sêmen (método de lavagem x gradiente de Percoll) e com diferentes diluidores (Diluidor controle x Diluidor Trolox).

Fragmentação de DNA em embriões cultivados por 7 dias: teste deTUNEL

Oócitos fertilizados com espermatozóides contendo antioxidante no diluidor demonstraram menor porcentagem de células apoptóticas do que a fertilização *in vitro* sem antioxidante no diluidor de sêmen e a taxa de fragmentação do DNA mostrou-se menor para o ML com antioxidante no diluidor (p<0,05) (Tabela 1). Não houve diferença do número total de células dos embriões (p>0,05)

Fator touro

Não se observou diferenças entre touros para a motilidade espermática progressiva e retilínea, porém verificaram-se diferenças significativas à morfologia espermática normal (Figura 5), às taxas de clivagem e blastocistos e à porcentagem de células apoptóticas dos embriões ($p < 0,05$). Os ejaculados do touro 1 tiveram mais espermatozóides anormais (49,8%), produzindo menos embriões (22,61%), embora a porcentagem de fragmentação do DNA, pelo teste de TUNEL, não foi a maior (3,8%). Em compensação, os ejaculados do touro 5, que apresentaram menos defeitos espermáticos (10,8%) e por isso produziram maior taxa de blastocistos (38,55%), também produziram embriões com maior porcentagem de apoptose (6,3%) ($p < 0,05$). (Figura 6 e 7, Tabela 2).

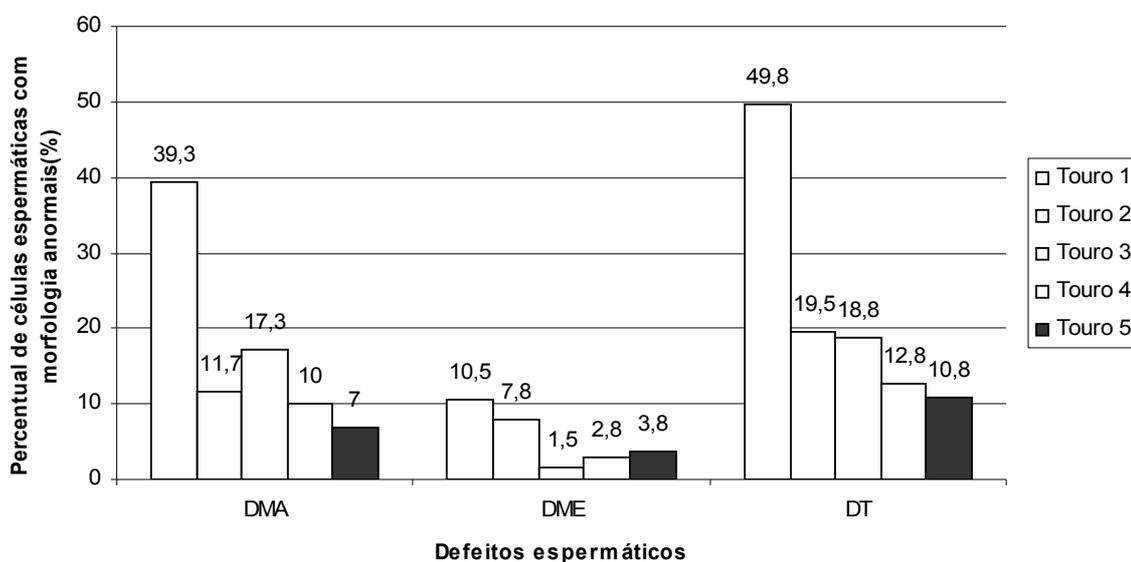


FIGURA 5. Porcentagem de patologia espermática (defeito maior, menor e total) dos cinco touros Nelore utilizados na fecundação *in vitro*, para produção de embriões.

TABELA 2. Número total de células (blastômeros) por blastocisto e porcentagem de fragmentação do DNA com a utilização de sêmen de cinco touros da raça Nelore.

Touros	N. Cels por blastocisto*	Fragmentação do DNA (%)**
1	84.7 ± 37.8 ^{ab}	3.8 ± 2.6 ^{bc}
2	76.1 ± 29.0 ^b	4.4 ± 4.0 ^b
3	74.9 ± 28.9 ^b	2.5 ± 2.8 ^c
4	87.6 ± 33.7 ^a	4.9 ± 2.8 ^b
5	95.3 ± 39.4 ^a	6.3 ± 3.1 ^a

*Média do número de células por blastocisto, calculado pelo número de blastômeros contados.

**Porcentagem de células apoptóticas, calculada pelo número de blastômeros.

^{a-c} Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($p < 0,01$), pelo Teste de Tukey.

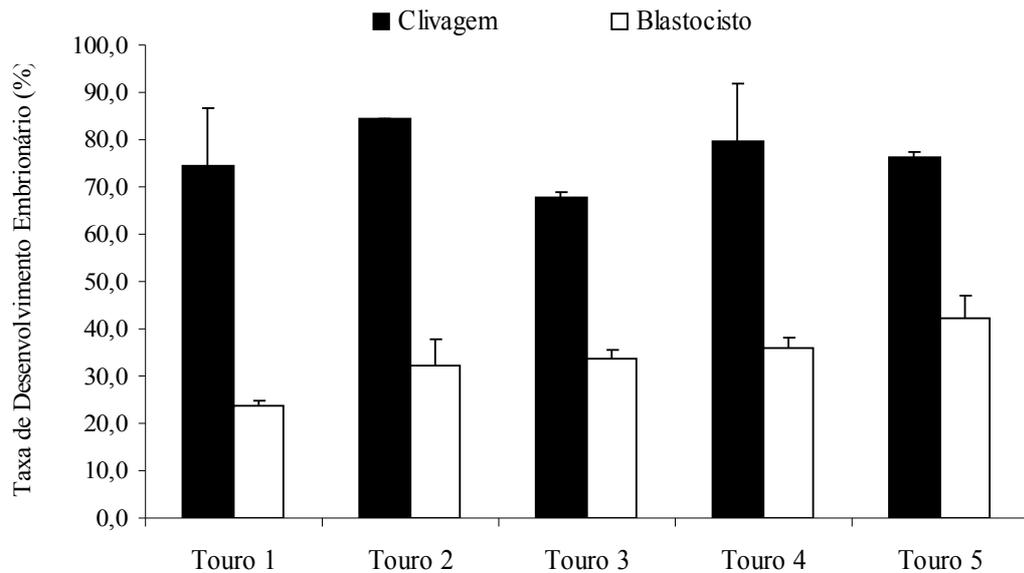


FIGURA 6. Taxa de desenvolvimento embrionário (clivagem e produção de blastocisto) de acordo com sêmen congelado/descongelado dos cinco touros da raça Nelore.

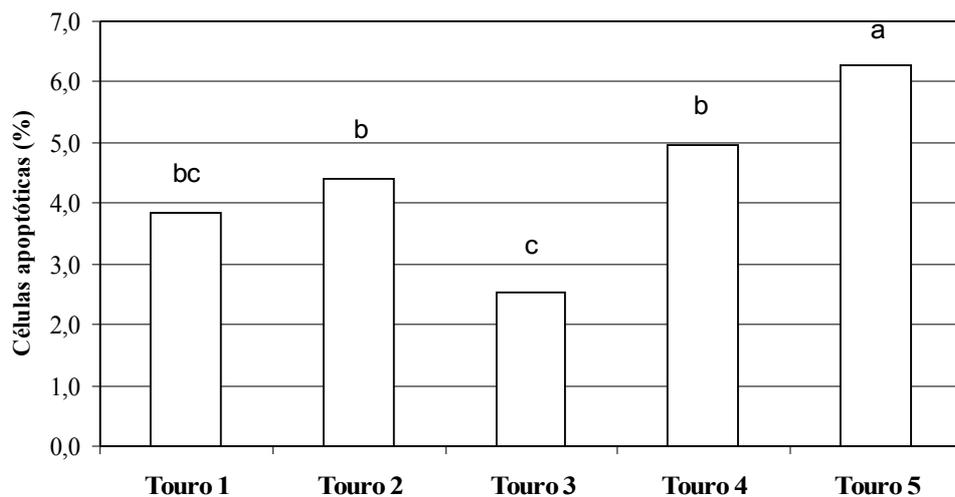


FIGURA 7. Porcentagem de células apoptóticas em embriões (blastocistos) produzidos *in vitro* com a utilização do sêmen criopreservado de cinco touros da raça Nelore. Letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey.

Discussão

Eventos como capacitação espermática, reação acrossômica e fusão com o óvulo ocorrem durante a fertilização e requerem membrana plasmática e acrossôma funcionais e intactos.

O processo de criopreservação, assim como, os métodos de separação espermática utilizados na FIV, causam injúrias nas células espermáticas diminuindo sua viabilidade.

Técnicas de preparação espermática são utilizadas rotineiramente na reprodução assistida com finalidade de isolar espermatozóides com melhor motilidade e morfologia espermática do plasma seminal, de espermatozóides danificados e de outros debris presentes no sêmen. Muitos estudos têm comparado diferentes métodos de processar o sêmen (i.e. simples lavagem, swim-up, etc.) com a técnica de separação por gradiente descontínuo de densidade. A separação espermática utilizando uma sílica baseada em gradiente de densidade (Percoll) mostrou ser o método mais eficiente para separar espermatozóides móveis e morfologicamente e geneticamente normais (BONGSO et al., 1993, SHARMA et al., 1997, DE MAISTRE et al., 1996). Observou-se neste experimento, que o método de separação espermática utilizando Percoll foi melhor do que o método de centrifugação por simples lavagem ($p < 0,001$) para PIV. O método de centrifugação por simples lavagem, devido ao pouco tempo e baixa força de centrifugação, selecionou menos espermatozóides móveis e morfologicamente normais produzindo menores taxas de blastocistos. No entanto, a taxa de clivagem não diferiu ($p > 0,05$) entre os métodos analisados.

Por causa do potencial de geração de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), decorrentes dos passos de centrifugação, utilizou-se o Trolox, análogo da vitamina E, no diluidor de sêmen bovino, com a finalidade de proteger a membrana plasmática, mantendo sua viabilidade. Outra fonte de produção de radicais livres, além do processo de criopreservação (WATSON, 1995 e 2000) e centrifugação, são os próprios espermatozóides morfologicamente anormais. Outros estudos demonstraram que homens inférteis tiveram como principal fonte de ROS as células espermáticas anormais (AITKEN e WEST, 1990; POTTS et al., 2000), inclusive BARROSO et al., 2000, confirmaram que espermatozóides obtidos de diferentes camadas depois da centrifugação no gradiente descontínuo de Percoll (fração pobre e rica de qualidade espermática) podem gerar ROS, sendo a fração pobre responsável pelo aumento significativo dos radicais.

Foram utilizadas doses de touros com diferentes porcentagens de defeitos espermáticos, principalmente para verificar se houve proteção das células espermáticas pelo antioxidante e se ocorreu seleção espermática pelos processos de separação do sêmen.

O tocoferol (vitamina E) é encontrado em membranas celulares, em contraste com o Trolox, que sendo solúvel em água, é encontrado no citoplasma, onde os radicais hidroxil são formados, permitindo então o bloqueio ao ataque oxidativo (CORT et al., 1975; ALBERTINI e ABUJA, 1999). A principal função da vitamina E é a proteção dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas plasmáticas. E a peroxidação dessas membranas lipídicas permitem a ocorrência

de defeitos estruturais, alterando a funcionalidade e permeabilidade das membranas, resultando eventualmente em injúrias irreversíveis e morte celular.

Os resultados na fertilização *in vitro* no presente estudo mostraram que a adição de antioxidante no diluidor de sêmen, a taxa de blastocisto foi melhor que no diluidor sem antioxidante ($p < 0,05$), sendo que a taxa de clivagem não diferiu ($p > 0,05$). O diluidor de sêmen com antioxidante processado pelo método do gradiente descontínuo de Percoll produziu mais embriões ($p < 0,05$), sugerindo a proteção do antioxidante para as células espermáticas selecionadas principalmente por este método (Tabela 1).

O fato da taxa de clivagem não diferir entre os tratamentos (com e sem antioxidante e as técnicas de separação espermática) sugeriu que além dos defeitos da membrana plasmática ocorreram fragmentação do DNA, com possível fertilização, mas sem posterior desenvolvimento embrionário. Em adição aos defeitos da membrana plasmática, a peroxidação lipídica pode também danificar o DNA sendo que a peroxidação do DNA pode alterar a cromatina, modificando bases e fragmentando o DNA (HUGHES et al., 1996; KODAMA et al., 1997; BAUMBER et al., 2003). Vários trabalhos reportaram redução do desenvolvimento embrionário após a fertilização de espermatozoides com defeito no DNA (SUN et al., 1997; HOST et al., 2000; MORRIS et al., 2002). HUGHES et al. (1998) sugeriu que algum defeito de DNA observado em uma população espermática pode ser removido com o plasma seminal durante a preparação para FIV, porém, como este processo também removeu os espermatozoides da principal fonte da proteção antioxidante, a adição de um antioxidante no meio resultou na proteção do DNA de defeitos subsequentes.

Utilizou-se a técnica de TUNEL para avaliar a porcentagem de apoptose dos embriões e observou-se baixos níveis de defeitos do DNA em blastocisto (dia 7), sugerindo proteção da membrana plasmática pelo efeito do antioxidante. Ambos os métodos de separação espermática, sem antioxidante no diluidor de sêmen, mostraram maiores níveis de apoptose. O nível de apoptose para o método de centrifugação por simples lavagem utilizando sêmen com diluidor contendo antioxidante foi significativamente ($p < 0,05$) menor quando comparado com o outro método (Tabela 1). Talvez o método de gradiente de densidade descontínuo devido ao maior tempo e força de centrifugação aumentou o percentual de DNA danificados, embora se acredite que, como foi o método com melhor produção de embriões (por selecionar os melhores espermatozoides), a porcentagem de apoptose pode ter sido maior pelo próprio desenvolvimento do blastocisto.

O ensaio do TUNEL detecta quebras no DNA. A desoxinucleotídeo transferase terminal é capaz de indicar falha na dupla fita de DNA, independentemente da causa. O método do TUNEL foi julgado como mais sensível e específico para detecção de apoptose. No entanto, a

detecção de fragmentos de DNA pelo ensaio do TUNEL pode apresentar falhas em distinguir entre apoptose, necrose e autólise celular (CHARRIAUT – MARLANGUE e BEN-ARI, 1995; GRASL-KRAUPP et al.,1995). A apoptose é a morte celular programada que ocorre em condições fisiológicas, como na formação da blastocle do embrião, e uma falha característica nesse processo, na ativação de uma endonuclease endógena, gera numerosos fragmentos no DNA (COMPTON, 1992).

Os resultados mostraram que a utilização do antioxidante no diluidor de sêmen ocorre menor porcentagem de apoptose nos embriões analisados. Embora ao separar os touros, quanto ao perfil de qualidade espermática, observou-se que o touro que mais produziu embriões foi também o que demonstrou alta porcentagem de fragmentação do DNA, sendo que o touro que menos produziu embriões, provavelmente por causa da elevada patologia espermática, produziu a menor porcentagem de células apoptóticas. Isto sugeriu que no primeiro caso a apoptose foi fisiológica, ou seja, necessária para o desenvolvimento embrionário e no segundo, em decorrência da alta anormalidade morfológica, pode ter ocorrido um dano genético (lesão ao DNA, porém não detectada) que levou a falha na indução da apoptose.

Muitos estudos demonstraram que ROS, em níveis controlados, podem ter funções fisiológicas na tradução de sinais e caminhos como na indução da fosforilação da proteína e alcalinização intracelular (KOSHIO et al., 1981; FIALKOW et al., 1994; BLONDIN et al., 1997). No entanto, quando em excesso podem levar a injúrias como, por exemplo, o câncer, em que as células perdem seu mecanismo de defesa, por inibição dos mecanismos apoptóticos (RACHID, 2002). Como não se conhece valores e/ou mecanismos que diferenciam apoptoses fisiológicas das patológicas, deve-se ter cautela na associação da porcentagem de apoptose com qualidade embrionária.

Conclusões

A taxa de clivagem foi similar para todos os tratamentos.

O método de separação espermática pelo gradiente de densidade descontínuo de Percoll foi melhor para a produção de embriões *in vitro*.

A utilização de antioxidante ao diluidor de sêmen utilizado na fecundação *in vitro* melhorou a produção de embriões.

O método de separação espermática pelo gradiente de densidade descontínuo de Percoll com o sêmen contendo antioxidante aumentou a produção de embriões *in vitro*.

A utilização de antioxidante ao diluidor de sêmen empregado na FIV propiciou a produção de blastocistos com menor percentual de fragmentação de DNA.

O touro que mais produziu embriões foi o que apresentou maior porcentagem de blastocistos com fragmentação de DNA.

Implicações

O antioxidante funcionou, pois melhorou a taxa de prenhez e produção de blastocisto *in vitro*.

Estudos bioquímicos para saber a interação do antioxidante com a célula espermática tornam-se necessários para entender os mecanismos de atuação do antioxidante.

Para obtenção do melhor efeito é necessário o conhecimento da dose e do indivíduo a ser utilizado.

Como não se conhece valores e/ou mecanismos que diferenciam apoptoses fisiológicas das patológicas deve-se ter cautela na associação da porcentagem de apoptose com qualidade embrionária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; SALEH, R.; BEDAIWY, M.A. A role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 829-843, 2003.

AGARWAL, A.; SAID, T.M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU International**, v. 4, p. 503-507, 2005.

AGUERO, A. MIRAGAYA, M.H.; MORA, N.G.; CHAVES, M.G.; NEILD, D.M.; BECONI, M.T.; Effect of vitamin E addition on equine preservation. **Comptes Rendus Biologies**, v.13, p.343-356, 1995.

AITKEN, R.J.; WEST, K.M. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. **International Journal of Andrology**, v. 13, p. 433-451, 1990.

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

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v. 10, p. 89-98, 1989.

AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L (Eds.), **Equine Reproduction**, Malvern: Lea e Febiger, p. 715-745, 1993

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7: 3, p.145-173, 1987.

AMELAR, R.D.; DUBIN, L.; SCHOENFELD, C. Sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 34, n.3, p. 197-215, 1980.

ANZAR, M., GRAHAM, E.F. Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen. **Theriogenology**, v.43, p. 439-449, 1995.

ANUALPEC, 2006, **Anuário Estatístico da Produção Animal**. São Paulo: FNP, 2006.

ANZAR, M.; LIWEI, H.; BURH, M.M.; KROETSCH, T.G; PAULS, K.P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 354-360, 2002.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos**. 2 Ed. Editora UFV, p 416, 2001.

ARRUDA, R.P.; BARNABÉ, V.H.; ALENCAR, M.M. Teste de termo-resistência rápido: uma opção para avaliar a fertilidade do sêmen congelado bovino. **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 12, Belo Horizonte, MG, 1997. Anais Belo Horizonte – MG, p. 178-179, 1997.

AURICH, J.E., SCHONHERR, U. et al. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v .48, p. 185-192, 1997.

AVERY, B., GREVE T. Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in insemination **Theriogenology**, v. 44, p. 871-878, 1995.

AZERÊDO, G.A. **Uso de sondas fluorescentes na avaliação da integridade de membrana plasmática de espermatozoides de caprinos (*Capra hircus* L.), submetidos à congelamento na presença e ausência de plasma seminal**. 1999. 72p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, 1999.

BAILEY, J.L., BUHR, M.M. Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science**, p. 45-51, 1993.

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

BALLACHEY, B.E.; EVANSON, D.P.; SAACKE, R.G. The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 109-115, 1988.

BARBOSA, R.T. **Avaliação morfológica e atividade respiratória de espermatozoides bovinos e suas relações com a fertilidade**. 1996. 107p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, 1996.

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

BARROSO, G.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1338-1344, 2000.

BARTH, A.D. e OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. 1° edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1989. 285pgs.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, p. 621-628, 2003.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, et al. The effect of reactive oxygen species on equine motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 895-902, 2000.

BECONI, M.T., FRANCA, C.R., MORA, N.G. Effects of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v.40, p. 841-851, 1993.

BENNETTS, L.E.; AITKEN, R.J. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 77-87, 2005.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRARD, M.A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, p. 1105-1122, 2002.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂ – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-288, 2001.

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

BLEIL, J. D.; WASSARMAN, P. M. Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of acrosome reaction by a zone glycoprotein. **Developmental Biology**, v. 95, p. 317-324, 1983.

BLONDIN P, COENEN K, SIRARD MA. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v. 18, p 454-460, 1997.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. **Nordisk Veterinær medicin**, v. 3, p. 83-391, 1973.

BOOTH, N.H., MCDOWELL. L.E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. Sexta edição, Editora Guanabara Koogan. S.A., Rio de Janeiro, 1992. 997pgs.

BORGES, J.C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificantes na criopreservação de sêmen bovino**. 2003. 56p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa – UFV – Viçosa, 2003.

BUEGE, J.A e AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BUENO, R. **Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento**. 2000. 91p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa – UFV – Viçosa, 2000.

BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, p. 535-543, 1993.

CASH, C.D. Are the reactive oxygen-derived species (ROS) interactive properties of the many therapeutic drugs from various categories pertinent to their beneficial effects. **General Pharmacology**, v. 28, p. 169-175, 1997.

CHANDONNET, L., ROBERTS, K.D., CHAPDELAIN, A et al. Identification of heparin – binding protein in bovine seminal plasma. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, p. 313-318, 1990.

CHAURRIAUT-MARIANGUE, C.; BEN-ARI, Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. **Neuroreport**, v. 7, p 61-64, 1995.

CHENOWETH, P.J. Influence of the male on embryo quality. **Theriogenology**, v. 68, p. 308-315, 2007.

CHOW, C.K. Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. **American Journal of Clinical and Nutrition**, v. 32, p. 1066-1081, 1979.

COMHAIRE, F.H., MAHMOUD, A.M.A. et al. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. **Human Reproduction**, v. 05, p. 393-398, 1999.

COMPTON, M.M. A biochemical hallmark of apoptosis: Internucleosomal degradation of the genome. **Cancer Metastasis Rev**, v. 11, p. 105-119, 1992.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as assay to frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v. 42, p. 351-360, 1994.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, p. 721-731, 1997.

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

CROSS, N.L., MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635-641, 1989.

DE LAMIRANDE, e., GANON, C. Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 258-266, 1993.

DE LEEUW, A.M.; DEN DASS, J.H.G. WOELDERS, H. Simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 12:2, p. 112-118, 1991.

DE MAISTRE, E.; BNE, M.C., FOLIGUET, B., TOUATI, F., FAURE, G.C. Centrifugation on Percoll gradient enhances fluorescent lectin binding on human sperm: a flow cytometric analysis. **Archives of Andrology**, v.37, p. 179-197, 1996.

DEN DAAS, J.H.G.; DELONG, G.; LANSBERGEN, L.; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. The relationship between the number of the spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1714-1723, 1998.

DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. **Animal Medicin Veterinary**, v. 4, p. 215-224, 1967.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl., n. 47 p. 243-255, 1993.

ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, p. 11-29, 2006.

ERNSTER, L. Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implications. In: **Active oxygen, lipid peroxides and antioxidants**. Ed: Yagi K, CRC Press, Boca Raton, 1-38, 1993.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology**. v. 23, p.1-13, 1986.

FAZELI, A.R.; SHANG, B.R.; STEENWEG, W. et al. Relationship between sperm-zone pellucida binding assays and the 56-day nonreturn rate of cattle inseminated with frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 853-863, 1997.

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

FIALKOW, L.; CHAN, C.K. ROTIN, D.; GRINSTEIN, S.; DOWNEY, G.P. Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants. **Journal of Biology Chemistry**, v. 269, p. 31234-31242, 1994.

FLESCH, F.M. e GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysic**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; SANTOS, A.D.F. et al. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 436-438, 2001.

FONSECA, V.O. **Fisiologia da Reprodução. In: Curso de Pós-Graduação “Latu Sensu” Tutoria a Distância Julgamento de Raças Zebuínas-FAZU/ABCZ**, 1, Uberaba, MG, Módulo V. Uberaba, p.128, 1999.

FOURNIER-DELPECH, S., THIBAUT, C. Acquisition of sperm fertilizing ability. **Reproduction Mammalian and Man**, p. 257-278, 1993.

FÜRST, R. **Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade**. 2002. 46p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, 2002.

GRASL-KRAUPP, B.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; KOUDELKA, H.; BUKOWSKA, K.; BURSH, W.; SCHULTE-HERMANN, R. In situ detection of fragment DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. **Hepatology**, v. 21, p. 1465-1468, 1995.

GRECO, E.; JACOBELLI, M.; RIENZI, L.; UBALDI, F.; FERRERO, S. Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. **Journal of Andrology**, v. 26, p. 349-353, 2005.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6.º edição, Editora Manole LTDA, São Paulo, 1995. 582pgs.

HALL, A.G. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 29, p. 238-245, 1999.

HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal Royal Microscopic Society**, v. 76, p. 84-97, 1957.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HENKEL, R.; KIERSPEL, E.; HAJIMOHAMMAD, M.; STALF, T.; HOOGENDIJK, C.; MEHNERT, C.; MENKVELD, R.; SCHILL, W.B.; KRUGER, T.F. DNA fragmentation and assisted reproduction technology. **Reproduction Biomed Online**, v. 7, p. 477-484, 2003.

HENRY, M; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. CBRA, 2ed., Belo Horizonte, 49p, 1998.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 03-22, 2000.

HOST, E.; LINDENBERG, S.; SMIDT-JENSEN, S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 79, p 559-563, 2000.

HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; MCKELVEY-MARTIN, V.J.; THOMPSON, W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human sperm from fertile and infertile man, using a modified comet assay. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, p. 613-619, 1996.

HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; MCKELVEY-MARTIN, V.J.; THOMPSON, W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Human Reproduction**, v. 13, p.1240-1247, 1998.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p .809-828, 1987.

JAAKMA, U, ZHANG, B.R., LARSSON, B. et al. Effects of sperm treatments on the in vitro development of bovine oocytes in semidefined and defined media. **Theriogenology**, v. 48, p. 711-720, 1997.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VER, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. et al. Development of an assay the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.

KESKES-AMMAR, L.; FEKI-CHARROUN, N.; REBAI, T.; SAHNOUN, Z.; GHOZZI, H.; HAMMANI, S.; ZGHAL, K.; FKI, H.; DAMAK, J.; BAHLOUL, A. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertility men. **Archives of Andrology**, v. 12, p. 83-94, 2003.

KOCA, Y.; OZDAL, O.L.; CELIK, M.; UNAL, S.; BALABAN, N. Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. **Archives of Andrology**, v. 49, p. 355-359, 2003.

KODAMA, H.; YAMAGUCHI, R.; FUKUDA, J.; KASAI, H.; TANAKA, T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. **Fertility Sterility**, v. 68, p. 519-524, 1999.

LEWIS, S.E.M.; AITKEN, R.J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell Tissue Research**, v. 322, p. 33-41, 2005.

MAGNAGO, L.G.P. **Avaliação física e morfológica do sêmen de cães da raça pastor alemão resfriado a 5°C**. 2000. 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária – UFMG - Belo Horizonte,2000.

MAIA, M.S **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS)**

no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox – C e Catalase. 2006. 147p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu, 2006.

MARTINS, L.F. **Avaliação do sêmen e proteínas solúveis do plasma seminal de bodes da raça pardo alpina.** 2001. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa – UFV – Viçosa, 2001.

MCDOWELL, L.R. **Vitamins in animal and human nutrition.** Iowa University Press, p.93, 2000.

MERKIES, K.; BEAN, L.D.; BOEHNKE, K.; BUHR, M.M. Effect of select lipids and vitamin E on motility and viability of liquid and cryopreserved boar spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, p. 81-88, 2003.

MILLER, D.J., HUNTER, G. Effect of osmolarity and glicosaminoglycans on motility, capacitation, acrossome reaction, and in vitro fertilizability of bovine ejaculated sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 2915-2924, 1986.

MILLER J.K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA E. Oxidative stress, antioxidants and animal function. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2812–2823, 1993.

MORRIS, I.D.; ILOTT, S., DIXON, L., BRISON, D.R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. **Human Reproduction**, v. 17, p. 990-998, 2002.

MOUSTAFA, M.H.; SHARMA, R.K.; THORNTON, J.; MASCHA, E.; ABDEL-HAFEZ, M.A.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. **Human Reproduction**, v. 19, p. 129-138, 2004.

NEILD, D. M.; GADELLA, B. M. et al. Membrane changes during different stages of a freeze – thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 876, p. 01-13, 2002.

NEUBER, E.; LUETJENS, C.M.; CHAN, A.W.S. et al. Analysis of DNA fragmentation of in vitro cultured bovine blastocysts use TUNEL. **Theriogenology**, v. 57, p. 2193-2202, 2002.

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

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reative oxygen species. **Human Reproduction**, v. 5, p. 399-420, 1999.

O'FLAHERTY, C.M., BEORLEGUI, N.B., BECONI, M.T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrossome reation. **Theriogenology**, v. 52, p. 289-301, 1999.

O'FLAHERTY, C.M., BEORLEGUI, N.B., BECONI, M.T. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrology**, v. 29, p. 269-275, 1997.

OLIVEIRA, E.C.S. **Viabilidade *in vitro* do sêmen de cão submetido a congelação com diferentes diluidores e crioprotetores**.2003. 63p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG - Belo Horizonte, 2003.

PARKS, J. E., GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PARKS, J. E., LYNCHY, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boas, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255-266, 1992.

PAULA – LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shok-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1169-1177, 2002.

PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85-98, 2003.

PICKETT, B.W., AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 1.^oed.: Lea e Febiger, Philadelphia. 1993.p. 769-789.

POTTS, R.J.; NOTARIANNI, L.J.; JEFFERIES, T.M. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. **Mutation Research**, v. 447, p. 249-256, 2000.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 403-407, 1980.

RACHID, M.A. **Apoptose**. Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/pat/apopt.htm>. Acesso em 23 de novembro de 2002.

RAO, A.R.; BANE, A.; GUSTAFSSON, B. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 14, n. 1, p. 1-12, 1980.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 77-86, 1994.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., LARSSON, B., PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction Fertility and Development**, v. 9, p. 297-308, 1997.

ROTA, A., PENZO, N.; VICENTI, L. et al. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1415-1420, 2000.

SAACKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S.; NEBEL, R.L.; BAME, J.H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 663-677, 2000 [special issue].

SAID, T.M.; PAASCH, U.; GLANDER, H.J.; AGARWAL, A. Role of caspases in male fertility. **Human Reproduction Update**, v. 10, p. 39-51, 2004.

SAID, T.M.; AZIZ, N.; SHARMA, K.; LEWIS-JONES, I.; THOMAS, A.J.; AGARWAI, A. Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in fertility male patients. **Asian Journal of Andrology**, v. 7, p. 121-126, 2005.

SANTOS, G.C.J. **Viabilidade de sêmen eqüino congelado em meios diluidores de diferentes composições**. 2003. 58p. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária), Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG - Belo Horizonte, 2003.

SHARMA, R.K.; SEIFARTH, K.; AGRAWAL, A. Comparison of single- and two-layer Percoll separation for selection of mobile spermatozoa. **International Journal Fertility and Womens Medicine**, v. 42, p. 412-417, 1997.

SAS. Institute, SAS (Statistical analyses system) User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, NC, ! 1996.

SAWYER, D.E.; ROMAN, S.D., AITKEN, R.J. Relative susceptibilities of mitochondrial and nuclear DNA to damage induced by hydrogen peroxide in two mouse germ cell lines. **Redox Report**, v. 6, p. 182-194, 2001.

SCOTT, M.A. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 337-348, 2000.

SCOTT, T.W. Lipid metabolism of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl v. 18, p. 65-76, 1973.

SILVA, M.R. **Taxa de gestação e avaliação de sêmen congelado/descongelado de touros da raça Nelore utilizando testes convencionais e de adesão in vitro de espermatozoides à zona pelúcida de ovócitos bovinos imaturos**. 2000. 75p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa – UFV – Viçosa, 2000.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 387-395, 2007.

SIKKA, S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 78-86, 1996.

SÖDERQUIST, L.; JANSSON, L.; LARSSON, K. et al. Sperm morphology and fertility in al bulls. **Journal of Veterinary Medicine Series A – Physiology Pathology Clinical Medic**, v. 38, p. 534-543, 1991.

SOUZA, N.L. **Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados de eqüinos**. 2001. 76p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP – Pirassununga, 2001.

STALHAMMAR, E.M.; JANSON, L.; PHILIPSSON, J. The impact of sperm motility on non-return rate in pre-selected dairy bulls. **Reproduction Nutrition Development**, v. 34, p. 37-45, 1994.

SUN, J.G.; JURISICOVA, A.; CASPER, R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 602-607, 1997.

SWENSON, M.J., REECE, W.O. DUKES **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11.ª edição, Editora Guanabara Koogan. S.A., Rio de Janeiro, 1996. 856pgs.

THÉRIEN, I., MOREAU, R., MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 768-776, 1998.

THÉRIEN, I., DLEAU, G., MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine – binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, v.

52, p. 1372-1379, 1995.

TRINCHERO, G. D., AFFRANCHINO, M. A., SHANG, L. M. et al. Antioxidant effect of bovine spermatozoa on lipid peroxidation. **Comptes Rendus Biologies**, v. 8, p. 339-350, 1990.

UPRETI, G.C., JENSEN, K. et al. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, v. 51, p. 275-287, 1998.

UPRETI, G.C., JENSEN, K. et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 269-278, 1997.

VALCÁRCEL, A., DE LAS HERAS, M. A., PÉREZ, L. et al. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 41, p. 483-489, 1994.

VASQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P. et al. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. **Theriogenology**, v. 47, p. 913-922, 1997.

VISHWANATH, R., SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. **Reproduction and Fertility Development**, v. 9, p. 321-331, 1997.

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

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

WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 483-492, 1981.

WHITFIELD, C.H.; PARKINSON, T.J. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by *in vitro* induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). **Theriogenology**, v. 44, n. 3, p. 413-422, 1995.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E., NEILL, J. **The Physiology of Reproduction**, 1.⁰ ed New York: Ed. Raven Press 1994., p.135-185.

ZALATA, A.A., DEPUYDT, C.E. While blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 154-162, 1998.

ZINI, A.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients :: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 183-188, 1993.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. 1998. 121p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu, 1998.

ANEXOS

Tabela 1A. Preparo da solução de frutose a 100 mOsm/Kg, empregado no teste hiposmótico

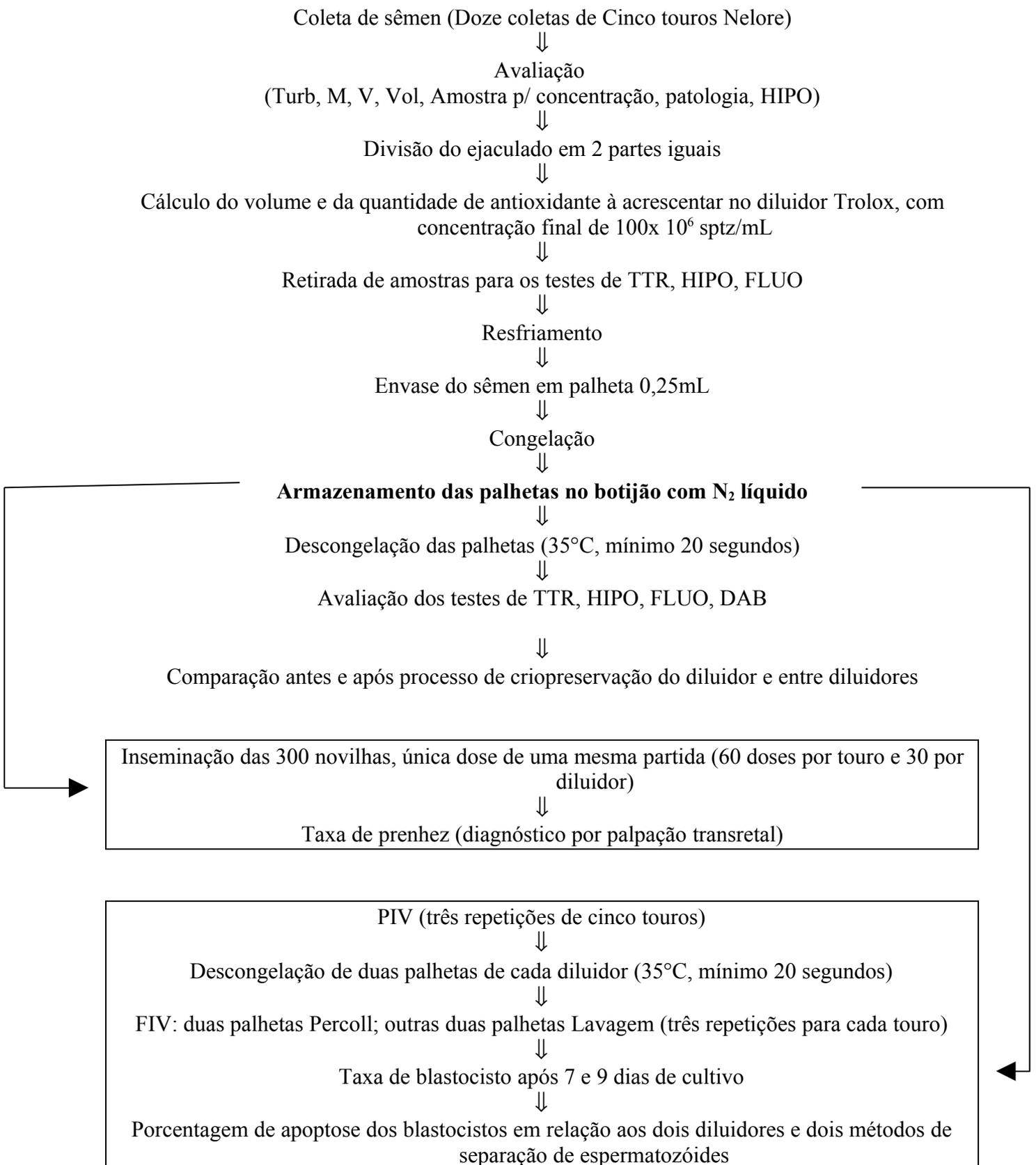
Reagente	Quantidade
Frutose (g)	0,9
Citrato Trisódico (g)	0,49
Água destilada (q.s.p.)	100 mL

Fonte: Revell e Mrode, (1994)

Tabela 2A. Solução estoque e de trabalho empregadas na técnica de fluorescência para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozóides bovinos

Soluções	Constituintes	Quantidades
I – Solução estoque de DIC	DIC	9,2mg
	DMSO	20mL
II – Solução estoque de IP	IP	10mL
	NaCl 0,9%	20mL
III – Solução estoque de Formaldeído	Formalina a 40% Solução fisiológica	Diluição 1:80
IV – Solução estoque de citrato de sódio a 3%	Citrato de sódio	3g
	Solução fisiológica	100mL
V – Solução de trabalho	DIC	20µL
	IP	10µL
	Formaldeído	10µL
	Solução IV	960µL
Amostras para avaliação	Sêmen	10µL
	Solução de trabalho	40µL

Fonte: Zúccari, C.E.S.N. (1998)



Anexo3: Fluxograma dos processos de congelação, descongelação e avaliação do sêmen bovino após descongelação e utilização em programa de inseminação artificial e fecundação *in vitro*.

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](#)