

JULIANA CORRÊA BORGES

**UTILIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTES ASSOCIADOS OU NÃO A  
EMULSIFICANTE NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-Graduação  
em Medicina Veterinária, para obtenção do  
título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2003

**JULIANA CORRÊA BORGES**

**UTILIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTES ASSOCIADOS OU NÃO A  
EMULSIFICANTE NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-Graduação  
em Medicina Veterinária, para obtenção do  
título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 28 de abril de 2003

---

Prof. Eduardo Paulino da Costa  
(Conselheiro)

---

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres  
(Conselheiro)

---

Prof. Giovanni Ribeiro Carvalho

---

Dr. José Reinaldo Mendes Ruas

---

Prof. José Domingos Guimarães  
(Orientador)

A Deus,

Por fazer cada dia de minha vida uma oportunidade.

A meus pais,

Irineu de Oliveira Borges e

Eisa Maria Corrêa Borges,

Por além de ensinar a trilhar os caminhos da vida, me darem condições para realizar meus sonhos sempre com muito amor e incentivo incondicional.

As minhas irmãs,

Carmen Lúcia e Luciana, pelo amor, amizade e admiração.

Ao Márcio,

Pelo amor, amizade, compreensão e apoio em todos os momentos.

Agradeço.

**Três frases fazem parte de minha vida, pois me ajudaram a acreditar, crescer e vencer os obstáculos:**

- 1) TEMPO É QUESTÃO DE PRIORIDADE**
- 2) NO FINAL TUDO DÁ CERTO**
- 3) DEIXA 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)

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

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Veterinária, por ter me acolhido e ser como minha segunda casa durante sete anos, possibilitando meu aprendizado muito além do profissional.

Ao professor José Domingos Guimarães, orientador deste trabalho, pelo incentivo, confiança e principalmente pela amizade e ensinamentos.

Ao meu conselheiro, profissional e sentimental, Eduardo Paulino da Costa, por seus ensinamentos, orientações e amizade, sempre querendo o melhor para mim.

Aos membros da banca examinadora, professores e amigos Ciro Alexandre Alves Torres, Giovanni Ribeiro de Carvalho e José Reinaldo Mendes Ruas por participarem desta equipe e estarem dispostos a clarear minhas dúvidas quando procurados.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo durante o período de mestrado.

À central de inseminação artificial, Yakult, por dar condições para realização deste experimento, em especial ao Adriano Rubio, diretor da empresa, e à Gabriela Mendes de Oliveira fundamental para a realização deste trabalho. Aos funcionários da empresa pela hospitalidade.

À Professora Simone Eliza Facione Guimarães pela amizade e por disponibilizar o Laboratório de Melhoramento Animal, do Departamento de Zootecnia, sempre que necessário.

Ao professor Joaquim Hernan Patarroyo pelos ensinamentos e por disponibilizar o microscópio de fluorescência do laboratório de parasitologia do BIOAGRO - UFV.

À Professora Maria Cristina Bacarat, por me ajudar quando precisei.

Ao Professor Júlio M. A.Araújo, por me auxiliar na busca de um protocolo e por me integrar ao mundo bioquímico me presenteando com seu livro.

Aos grandes amigos Álan e Vitinho, o primeiro por ter sido meu primeiro orientador e ter me ingressado ao mundo científico na área de Reprodução Animal, e ao segundo, por me mostrar o prazer de ensinar.

Ao Rogério, amigo e anjo da guarda, por estar sempre disposto a me ajudar e por ter me auxiliado na procura de um novo protocolo.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Veterinária da UFV, pelo auxílio, amizade e anos de convívio, que serão sempre lembrados. Em especial à Rose, Cléia e Geraldinho que sempre nos ajudaram, principalmente, na hora do aperto.

Ao Seu Nenzinho, funcionário do Laboratório de Reprodução Animal, por sua dedicação, amizade e ótimo humor.

Aos professores e funcionários do Departamento de Zootecnia da UFV, pelo auxílio e amizade.

Aos estagiários: Marco, Rodrigo, Lafon, Fábio, Ronaldo, Luciano, Pituco, Natália, Fabrice, Raphael, Giorgia, Roberta, Camila, Ariel, Adolfo, Aline, Caroline e aos demais estagiários do Laboratório de Reprodução, pelo convívio, auxílio e participação durante o pré-experimento e na segunda fase do experimento que foi realizado em Viçosa.

Ao Belmiro por me ceder o touro no período do pré-experimento.

À Érika Christina pela disponibilidade e auxílio na técnica de fluorescência e a Universidade Federal de Minas Gerais por disponibilizar o uso do microscópio.

Ao amigo muito especial Anderson pelo convívio, carinho e apoio sempre que precisei.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Animal Clebinho, Daniel, Érica, Flávio, Jeanne, Letícia, Luis Gustavo (Praguinha), Melissa, Moacir, Thiago por terem caminhado comigo nos bons e maus momentos compartilhando mais do que um aprendizado acadêmico, e aos demais colegas de pós-graduação pelo agradável convívio durante estes anos, em especial ao Carlos, Richard, Viviane e Luciano.

As mais que amigas, minhas irmãs, Vanessa, Aline, Marilú e Cristiane pelos momentos inesquecíveis que palavras jamais expressariam tamanho sentimento.

Aos amigos Jecas – Jóias e agregados, que mesmo distantes fisicamente estiveram por perto.

Aos amigos André, Cristiane, Emiliane, Juninho, Laisa, Luciana, Luciano Melo, Marquinhos, Marco Aurélio, Rildo, Sandro pela agradável e inesquecível convivência.

Aos amigos de Viçosa.

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 de Oliveira Borges e Eisa Maria Corrêa Borges, nasceu na cidade de São Paulo, São Paulo, em 27 de julho de 1976.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, em 1996, graduando-se em março de 2001.

Em abril de 2001, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária, na área de Reprodução Animal, nessa mesma Universidade, tendo concluído o mesmo em abril de 2003.

## ÍNDICE

|                                                                        | Página |
|------------------------------------------------------------------------|--------|
| LISTA DE TABELAS .....                                                 | ix     |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                 | xi     |
| RESUMO .....                                                           | xii    |
| ABSTRACT .....                                                         | xiv    |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                     | 1      |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                         | 3      |
| 2.1. Estrutura dos espermatozóides.....                                | 3      |
| 2.2. Componentes lipídicos da membrana espermática e suas funções..... | 4      |
| 2.3. Capacitação espermática e reação acrossômica.....                 | 6      |
| 2.4. Radicais livres e antioxidantes.....                              | 9      |
| 2.5. Diluentes e crioprotetores .....                                  | 14     |
| 2.6. Criopreservação espermática .....                                 | 17     |
| 2.7. Testes complementares.....                                        | 18     |
| 2.7.1. Características físicas e morfológicas do sêmen.....            | 19     |
| 2.7.2. Teste de termo-resistência .....                                | 20     |
| 2.7.3. Teste hiposmótico .....                                         | 20     |
| 2.7.4. Teste de fluorescência.....                                     | 21     |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                             | 23     |
| 3.1. Coleta de sêmen.....                                              | 23     |



|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2. Aspectos físicos e morfológico do sêmen.....                                    | 24 |
| 3.3. Meios diluidores de criopreservação .....                                       | 25 |
| 3.3.1. Preparação das soluções estoques.....                                         | 25 |
| 3.3.2. Diluição final .....                                                          | 26 |
| 3.4 Resfriamento, congelamento e descongelamento.....                                | 27 |
| 3.5. Testes complementares .....                                                     | 27 |
| 3.5.1. Teste de termo-resistência lento .....                                        | 28 |
| 3.5.2. Teste hiposmótico .....                                                       | 28 |
| 3.5.3. Teste de integridade da membrana plasmática (fluorescência) .....             | 28 |
| 3.6. Análise estatística .....                                                       | 29 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                      | 31 |
| 4.1. Características físicas e morfológicas do sêmen <i>in natura</i> e diluído..... | 31 |
| 4.2. Teste de termo-resistência em sêmen diluído e congelado/descongelado.....       | 33 |
| 4.3. Teste hiposmótico em sêmen <i>in natura</i> e congelado/descongelado .....      | 37 |
| 4.4. Teste de fluorescência em sêmen congelado/descongelado .....                    | 39 |
| 5. CONCLUSÕES .....                                                                  | 44 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                  | 45 |
| 7. ANEXO .....                                                                       | 56 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                               | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tabela 1 Composição do meio diluidor Tris modificado .....                                                                                                                                                    | 25     |
| Tabela 2 Características físicas e morfológicas do sêmen <i>in natura</i> e células reativas ao teste hiposmótico de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação .....      | 32     |
| Tabela 3 Percentual médio da motilidade espermática progressiva retilínea no teste de termo-resistência (TTR) do sêmen bovino, diluído e não congelado em diferentes meios diluidores de criopreservação..... | 34     |
| Tabela 4 Média do vigor espermático (0-5) no teste de termo-resistência (TTR) no sêmen bovino, diluído e não congelado em diferentes meios diluidores de criopreservação.....                                 | 34     |
| Tabela 5 Média percentual da motilidade espermática progressiva retilínea após descongelamento no teste de termo-resistência (TTR) de sêmen bovino, diluído em diferentes meios de criopreservação.....       | 35     |
| Tabela 6 Média do vigor espermático (0-5) no teste de termo-resistência (TTR) após descongelamento do sêmen bovino, diluído em diferentes meios de criopreservação.....                                       | 37     |

|                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 7 Média de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (HO) pré e pós congelamento, de sêmen bovino diluído em diferentes meios diluidores .....                                             | 39 |
| Tabela 8 Percentual médio de células espermáticas íntegras nos diferentes meios diluidores de criopreservação, observadas em sêmen congelado/descongelado de touros, pelo teste de fluorescência..... | 40 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Motilidade espermática progressiva retilínea de sêmen bovino, in natura e pós descongelado, diluído em diferentes meios diluidores de criopreservação durante o teste de termo-resistência.....          | 35 |
| Figura 2 Vigor espermático de sêmen bovino, in natura e descongelado, diluídos em diferentes meios diluidores de criopreservação durante o teste de termo-resistência ....                                        | 37 |
| Figura 3 Valores médios de células espermáticas reagidas de sêmen bovino in natura e congelado/descongelado diluído em diferentes meios diluidores de criopreservação, observados pelo teste hiposmótico .....    | 39 |
| Figura 4 Percentual médio de espermatozóides com membranas íntegras em sêmen bovino congelado/descongelado diluído em diferentes meios diluidores de criopreservação, observados pelo teste de fluorescência..... | 41 |
| Figura 5 Valores médios obtidos no teste hiposmótico e de fluorescência de sêmen bovino congelado/descongelado diluído em diferentes meios diluidores de criopreservação para sêmen bovino.....                   | 42 |

## RESUMO

BORGES, Juliana Corrêa, M. S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2003. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino.** Orientador: José Domingos Guimarães. Conselheiros: Eduardo Paulino da Costa e Ciro Alexandre Alves Torres.

Este estudo teve o objetivo de avaliar a eficácia de diferentes associações de antioxidantes naturais no congelamento de sêmen bovino. Dezoito ejaculados de três touros foram utilizados para testar as seguintes associações dos componentes: **T1**- meio Tris-gema (controle), **T2**-controle + equex, **T3**- controle + vitamina E + equex, **T4**- controle + vitamina C, **T5**- controle + vitamina E + equex e vitamina C. O ejaculado foi distribuído igualmente em cinco tratamentos, com concentração final de  $100 \times 10^6$  espermatozóides por mL, envasados em palhetas de 0,5 mL. Estas palhetas permaneceram resfriadas por cinco horas quando foram congeladas em nitrogênio líquido. O descongelamento foi realizado submergindo as palhetas em banho-maria a 37°C por no mínimo trinta segundos. Os parâmetros de turbilhonamento, motilidade espermática progressiva retilínea, vigor, patologia espermática, longevidade e integridade das células espermáticas pelos testes de termo-resistência e hiposmótico foram avaliados antes e após o congelamento. A motilidade espermática progressiva retilínea não diferiu entre os valores médios observados nos tratamentos nem antes, nem após o congelamento ( $p > 0,05$ ). Já o vigor observado no tratamento 5 foi maior após descongelamento, comparado aos demais grupos

experimentais, (3,51;  $p < 0,05$ ). Na avaliação da integridade funcional e estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides, os valores médios obtidos nos tratamentos 2, 3, 4 e 5 (29,67, 36,55, 31,83, 35,78%, respectivamente) diferiram favoravelmente aos obtidos no tratamento 1 (controle; 25,17%), com a utilização do teste de fluorescência. Pode-se concluir que a utilização dos antioxidantes no diluente de sêmen bovino para o processo de criopreservação protege a membrana plasmática dos espermatozoides, embora não tenha aumentado a motilidade espermática progressiva retilínea. E que o equex foi eficaz como emulsificador do tocoferol e também protegeu a membrana plasmática quando utilizado sozinho.

## ABSTRACT

BORGES, Juliana Corrêa, M. S., Universidade Federal de Viçosa, April 2003. **The use of antioxidants associated or not with emulsified agent in bovine semen cryopreservation.** Advisor: José Domingos Guimarães. Committee members: Eduardo Paulino da Costa and Ciro Alexandre Alves Torres.

The objective of this study was to evaluate the efficacy of different associations of natural antioxidants in freezing the bovine semen. Eighteen ejaculates from three bulls were used to test the following associations: T1 – TRIS egg yolk extender (control group); T2 – control + equex; T3 – control + Vitamin E + equex; T4 – control + Vitamin C; T5 – control + Vitamin E + equex and Vitamin C. The ejaculate was equally distributed in five treatments with a final concentration of  $1000 \times 10^6$  sperm cells/ml and they were envased in 0.5 mL straws. The straws were cooled for five hours and then frozen in liquid N<sub>2</sub>. The thawing of the samples was made by immersion of the straws in a 37<sup>0</sup> C water-bath for 30 seconds. Motility, vigor, pathology, longevity and integrity of sperm cells were evaluated by hiposmotic and termoresistance test pre and pos-freezing. There was no difference ( $P > 0.05$ ) in motility among treatments neither pre nor pos-freezing. In the pos-thawed semen T5 showed the best vigor (3.51;  $P < 0.05$ ). There was significant ( $P < 0.05$ ) difference between medium values obtained in T 2, T3, T4, T5 (29.67; 36.55; 31.83; 35.78; respectively) and the value obtained in T1 (control; 25.17). Treatments 2, 3, 4, 5 showed higher values for functional and structural integrity of sperm plasma membrane than

showed treatment 1, as observed in the fluorescent test. It may be concluded that the use of antioxidants in bovine semen extender for cryopreservation protects sperm plasma membrane, although it did not increase the sperm motility.



## **1. INTRODUÇÃO**

A inseminação artificial em bovinos é a biotécnica aplicada à reprodução com maior difusão e impacto no melhoramento genético no mundo. Essa técnica possui importantes vantagens como: melhoramento do rebanho em menor tempo e baixo custo por meio da utilização de sêmen de reprodutores comprovadamente provados para a produção de leite e carne; controle de doenças que pela monta natural poderiam ser transmitidos às vacas; utilização de touros com problemas adquiridos e impossibilitados de efetuarem a monta; obtenção de maior número de descendentes de um reprodutor; padronização do rebanho; nascimento de filhos após a morte do pai, face à possibilidade de congelamento e estocagem de sêmen, entre outras. Com isso, a utilização da inseminação artificial apresenta inúmeras vantagens tornando a relação custo/benefício bastante lucrativa.

O sêmen de boa qualidade é um dos fatores de fundamental importância para o sucesso da técnica, por isso seu processamento deve preservá-lo ao máximo. Os processos de congelamento e descongelamento causam diminuição do número de espermatozóides viáveis por dose (AMANN e PICKET, 1987; WATSON, 1995), sendo assim, ao diminuir ou cessar qualquer tipo de injúria que os comprometam, haverá a possibilidade de diminuir a concentração espermática por dose de sêmen congelado e talvez a chance de flexibilizar o horário da inseminação, porém muitos estudos devem ser realizados para que tais hipóteses sejam comprovadas.

Uma das injúrias ocasionadas aos espermatozóides é a peroxidação lipídica das membranas (JONES e MANN, 1977) causada pelo estresse oxidativo devido à produção excessiva de radicais livres, os quais estão associados com o declínio da fertilidade do sêmen após o período de estocagem (MAXWELL e WATSON, 1996).

Buscando melhora na preservação da integridade celular, a associação de componentes antioxidantes tem sido utilizada nos meios de congelamento de sêmen de várias espécies inclusive, a espécie bovina, no intuito de reduzir essas alterações causadas à membrana dos espermatozóides (BECONI et al., 1993).

O objetivo do presente estudo foi testar meios diluidores contendo antioxidantes naturais, com intuito de melhorar a manutenção das estruturas e funções espermáticas pós-congelamento, utilizando-se para isto o teste de termo-resistência lento, o teste hiposmótico e o teste de fluorescência.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Estrutura dos Espermatozóides**

Ao microscópio óptico os espermatozóides parecem consistir essencialmente de duas partes: cabeça e cauda. Ao microscópio eletrônico a cabeça é dividida em quatro regiões: apical, pré-equatorial, equatorial e pós-equatorial, onde se localiza o acrossoma e o núcleo, a cauda é observada como sendo subdividida em colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal (DELLMANN e BROWN, 1982). Contudo 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). Esta membrana é uma estrutura fina, flexível, auto-selante e seletivamente permeável aos solutos polares, com espessura de apenas 7,5 a 10nm, formada quase que inteiramente por proteínas e lipídios (GUYTON e HALL, 1997), sendo que proporções relativas desses componentes

são distintas em diferentes tipos de membranas (LEHNINGER et al., 2000). A composição lipídica é característica para cada reino, espécie, tecido e organela de um certo tipo celular (SCOTT, 1973). A composição de proteínas das membranas de regiões diferentes varia mais do que a composição de lipídios, refletindo a especialização funcional. Independente da membrana, esta consiste em três zonas: a bicamada lipídica, a superfície de contato entre os fosfolipídios e a água e o glicocálice. Além disso, proteínas se encontram adsorvidas na superfície da membrana ou em seu interior fazendo parte da estrutura (AMANN e GRAHAM, 1993; LEHNINGER et al., 2000). As proteínas interligadas com os lipídios são classificadas como integrais ou periféricas. As proteínas integrais são liberadas da membrana apenas por solventes ou detergentes, sendo essenciais para sua estrutura (AMANN e GRAHAM, 1993). As proteínas periféricas, por outro lado são solúveis em diluidores seminais e água, sendo facilmente removidas. As proteínas integrais agem como poros ou canais através da membrana, como receptores para outras moléculas ou são encontradas entre as duas bicamadas da membrana (AMANN e PICKETT, 1987).

## **2.2. Componentes Lipídicos da Membrana Espermática e suas Funções**

O modelo mosaico da membrana é fluido, pelo fato das interações entre os lipídios e as proteínas não serem covalentes, permitindo que as moléculas individuais dos lipídios e das proteínas movam-se lateralmente no plano da membrana. Os lipídios de membrana são assimétricos na sua distribuição nas duas faces da bicamada, embora a assimetria, ao contrário daquela das proteínas da membrana, não seja absoluta. Na membrana plasmática, certos lipídios são tipicamente encontrados na face externa da camada (esfingomielina e fosfatidilcolina) e outros na face interna, região citoplasmática (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol) (LEHNINGER et al., 2000), sendo o principal constituinte que confere à membrana a característica de fluidez, a qual depende tanto da composição quanto da temperatura, sendo que a mudança de estado líquido para gel em membranas com maior proporção de lipídios de cadeia insaturada se dará em menores temperaturas (ALBERTS et al., 1997). O conteúdo esterol da membrana também é um determinante importante desta temperatura de transição. A estrutura plana rígida do grupo esteróide, inserida entre as cadeias laterais dos ácidos graxos, tendem a moderar os extremos de solidez e fluidez das membranas.

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 (AMANN e PICKET, 1987; PARKS e GRAHAM, 1992; WATSON, 1995).

Embora exista diferença considerável entre as espécies de mamíferos, em geral a membrana plasmática contém aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (em base molar) (FLESH e GADELLA, 2000).

Os fosfolipídios parecem ser a fonte principal de substrato para respiração endógena dos espermatozóides (Mann, 1964, citado por SCOTT, 1973). Segundo SCOTT (1973) os tipos de fosfolipídios presentes nos espermatozóides variam consideravelmente de uma espécie para outra, sendo que plasmalogencolina é o principal fosfoglicerídio dos espermatozóides dos ruminantes domésticos. Esses fosfoglicerídios são hidrolizados e há liberação de ácidos graxos, que são oxidados rapidamente, promovendo desta maneira energia celular (MILLS e SCOTT, 1969). O principal ácido graxo poliinsaturado dos fosfolipídios colina é o ácido docosaheptaenóico (22:6); enquanto que da fração fosfolipídica etanolamina, o ácido linoleico (18:2) é o principal ácido graxo insaturado. Ocorre aumento na proporção de ácidos graxos poliinsaturados dos espermatozóides durante sua fase de maturação no epidídimo, devendo ter efeito pronunciado nas propriedades físicas e químicas da membrana lipoproteica (VANDENHEUVEL, 1971). Assim, qualquer mudança que ocorra em cada fosfolipídio individual ou na composição de seus ácidos graxos, ocorrerá alteração na estrutura e função da membrana dos espermatozóides.

O colesterol é o principal esteróide dos espermatozóides ejaculados (CROSS, 1998) e algumas dessas moléculas sugerem ser importantes reguladores da função espermática (LANGLAIS e ROBERTS, 1985). *In vitro*, a adição de colesterol ao meio previne os espermatozóides de tornarem-se capazes de iniciar a reação acrossômica (ZARINTASH e CROSS, 1996) ou fertilizar ovócitos (GO e WOLF, 1985), porém, geralmente promove a fusão da membrana mais que a inibe (CHERNOMORDIK et al., 1995).

No modelo proposto por Davis (1978) citado por CROSS (1998) um

ejaculado *in natura* possui alta taxa de colesterol/fosfolipídio; e durante a capacitação, o colesterol se move da membrana espermática para “solubilizar proteínas e receptores”, e os fosfolipídios se movem para dentro da membrana espermática. A baixa taxa de colesterol/fosfolipídio diminui a microviscosidade da membrana, expondo os fosfolipídios da membrana, e talvez permitindo aumentar o influxo de cálcio, conduzindo a reação acrossomal. Em algumas espécies a concentração de colesterol na membrana plasmática se altera com a passagem dos espermatozóides pelos epidídimos. A taxa colesterol/fosfolipídio da membrana plasmática dos espermatozóides de carneiros e bodes aumenta durante o trânsito epididimário (PARKS e HAMMERSTEDT, 1985; RANA et al., 1991), entretanto diminui para ratos e eqüinos (HALL et al., 1991) e não se altera para suínos (NIKOLOPOULOU et al., 1985). Os espermatozóides emitidos no ejaculado podem obter colesterol adicional do plasma seminal. O colesterol reside nas lipoproteínas e nas vesículas (CROSS, 1998).

### **2.3. Capacitação Espermática e Reação Acrossômica**

Os espermatozóides localizados na cauda do epidídimo são capazes de fecundar ovócitos, mas, ao entrar em contato com o plasma seminal durante a ejaculação, estas células são recobertas por proteínas (fatores decapacitantes) que impedem a ocorrência da reação acrossomal (YANAGIMACHI, 1994).

E para adquirir novamente o potencial de fecundação, os espermatozóides de bovinos precisam passar por uma série de mudanças fisiológicas e bioquímicas no trato reprodutivo feminino, denominadas de capacitação e reação acrossomal (YANAGIMACHI, 1994). Deste modo, 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 (FOURNIER-DELPECH et al., 1993; HAFEZ, 1995; O'FLAHERTY et al., 1997 e 1999; BILODEAU et al., 2000).

O efluxo de colesterol começa logo após a separação dos espermatozoides do plasma seminal. Parece ser dirigido pela ação de moléculas lipofílicas do meio, como a albumina e lipoproteínas. A perda do colesterol permite o aumento do pH intracelular (de 6,7 para 6,92) fazendo com que o acrossoma se torne responsivo. Há elevação dos níveis de bicarbonato intracelular, implicando no aumento da concentração de íons de cálcio e ativação da adenilatociclase (FLESCHE e GADELLA, 2000).

Os agentes indutores da capacitação mais utilizados são o cálcio (LAPOINTE e SIRAND, 1996) e os glicosaminoglicanos, destacando a heparina como mais eficiente dentro deste grupo (PARRISH e SUSKO-PARRISH, 1988).

Os mecanismos da indução da capacitação pela heparina envolvem ligações reversíveis e exotérmicas com os espermatozoides, alterações das proteínas da membrana plasmática e dos sítios de ligação de proteínas, como exemplo, as lecitinas (MAHMOUD e PARRISH, 1996), ativando os canais iônicos para elevação de cálcio, pH e AMP cíclico (THÉRIEN et al., 1998), além de acelerar a conversão da proacrosina em acrosina (YANAGIMACHI, 1994). A proacrosina é uma proteína localizada na vesícula acrossomal, sendo liberada provavelmente por proteólise (KIM et al., 2001).

Há indícios que os processos de capacitação sejam estimulados por lipoproteínas de alta densidade (HDL), provenientes do fluido 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 espermatozoides, 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.

Os estágios finais da capacitação parecem acontecer na parte inferior do *isthmus* (SCOTT, 2000), sendo que o processo de fecundação ocorre na ampola (HAFEZ, 1995; LEFEBVRE e SUAREZ, 1996).

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).

O acrossomo é a estrutura limite dos espermatozóides, em forma de capuz, que recobre a porção anterior do núcleo. Possui em torno de 20 enzimas hidrolíticas localizadas na vesícula acrossomal, sendo as mais estudadas a acrosina e a hialuronidase (YANAGIMACHI, 1994).

Estas enzimas permitem que a membrana acrossomal externa seja destruída (digerida) ou destacada dos espermatozóides mortos ou moribundos. Isso faz com que estes espermatozóides se pareçam com os que sofreram, ou estão sofrendo reação acrossomal (YANAGIMACHI, 1994). Esse processo é conhecido como “falsa reação acrossomal”, sendo necessário distingui-lo da verdadeira reação acrossomal, que ocorre fisiologicamente nos espermatozóides vivos e móveis (YANAGIMACHI, 1994).

A verdadeira reação acrossomal envolve múltiplas funções entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática, permitindo que o conteúdo do acrossomo seja liberado através da membrana fenestrada (THÉRIEN et al., 1995). Os locais onde estas fusões se iniciam são aqueles onde a membrana acrossomal externa é menos estável e onde há maior quantidade de sítios de ligação para o cálcio (YANAGIMACHI, 1994).

O influxo de cálcio é um passo essencial para a reação acrossomal nos espermatozóides de mamíferos (BAILEY e BUHR, 1993), onde os mesmos, inativam a bomba de sódio-potássio-ATPase, resultando em rápido aumento de sódio intracelular, promovendo o efluxo do íon hidrogênio, levando ao aumento do pH intracelular (YANAGIMACHI, 1994). Substâncias fusogênicas, como o ácido aracdônico e lisofosfolipídios, são produzidas pela ativação das fosfolipases da membrana pelo cálcio.

A criopreservação eleva os níveis de cálcio intracelular, assim como a capacitação (WATSON, 2000). Conseqüentemente, a reação acrossomal em espermatozóides provenientes de sêmen congelado pode ser realizada em tempo menor que o necessário para sua indução *in natura* no trato genital da fêmea (O'FLAHERTY et al., 1999, WATSON, 2000).



A falsa reação acrossomal é possível porque íons intracelulares podem sair de dentro das células, permitindo a entrada de outros íons extracelulares, desencadeando outros processos que levam a desestabilização da membrana. A proacrosina pode ser convertida em acrosina que digerirá a matriz acrossomal. Acrosina e outras enzimas da matriz atacam as membranas espermáticas resultando no seu desaparecimento (YANAGIMACHI, 1994). Esse processo ocorre durante a senescência ou degeneração dos espermatozoides.

Os espermatozoides dos mamíferos são extremamente sensíveis aos danos oxidantes induzidos por alta concentração de oxigênio (MacLeod, 1943; citado por O'FLAHERTY et al., 1997 e 1999) que ocasiona a peroxidação das membranas (JONES e MANN, 1977), provocando a desestabilização da bicamada fosfolipídica, permitindo a ativação acrossomal (HAFEZ, 1995) e diminuindo a viabilidade do sêmen.

## **2.4. Radicais Livres e Antioxidantes**

A oxidação de lipídios é um exemplo típico de reação envolvendo radicais livres (ARAÚJO, 2001). Segundo o autor, a velocidade de reação de oxidação depende do grau de insaturação na molécula do ácido graxo, assim, quando 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) torna-se altamente sensível às espécies reativas de oxigênio (ROS) (COMHAIRE et al., 1999; OCHSENDORF, 1999).

O organismo produz naturalmente radicais livres e outras espécies reativas oriundas do oxigênio pelo próprio metabolismo, como subprodutos da respiração e da síntese de estruturas mais complexas. Baixas concentrações de radicais livres são importantes para processos bioquímicos normais como na sinalização e no controle do crescimento celular, no ataque de patógenos invasores, na síntese enzimática de processos bioativos pelas ciclooxigenases, lipoxigenases e pelo nucleotídeo redutase (formação de deoxirribonucleotídeos a partir de ribonucleotídeo), na detoxificação de substâncias estranhas. Porém, quando sua produção ocorre em quantidade superior à capacidade de neutralização pelas células, distúrbios celulares e metabólicos ocorrerão de diversas maneiras.

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, 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.

Os termos espécies de oxigênio reativas (ROS) se referem a todos radicais livres ou espécies de oxigênio ativas, tais como, radical livre superóxido, radical hidroxil, peróxido de hidrogênio 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).

O processo de geração de (ROS) é componente chave de processos como: inflamação, isquemia, envelhecimento e carcinogêneses. Por isso que, o desbalanço entre oxidante e antioxidante favorece a formação de peróxidos causando estresse oxidativo e consequentemente sequelas patológicas (OCHSENDORF, 1999).

O estresse oxidativo é um fator associado com a diminuição da fertilidade durante a estocagem do sêmen (TRINCHERO et al., 1990; O'FLAHERTY et al., 1997; BILODEAU et al., 2000). A geração de (ROS) em excesso parece estar envolvida nos danos causados na membrana plasmática e no DNA dos espermatozoides (OCHSENDORF, 1999) em condições hipotérmicas de estocagem (MAXWELL e WATSON, 1996).

Embora os espermatozoides dos bovinos não sofram facilmente peroxidação quando comparados com os espermatozoides do humano, do garanhão e do bode, o sêmen congelado e descongelado é mais susceptível a peroxidação lipídica do que o sêmen *in natura* (TRINCHERO et al., 1990). Já para o sêmen de equino, o peróxido de hidrogênio é o principal radical livre responsável pelas alterações que levam a perda da motilidade espermática (BAUMBER et al., 2000).

A maioria das espécies vivas possui 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. Diversas enzimas estão envolvidas nesse mecanismo: a superóxido dismutase, remove o radical superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio; a catalase, destrói o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e oxigênio; a glutatona peroxidase, é a mais importante na remoção de peróxido nas células; os antioxidantes, como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido

ascórbico (vitamina C) entre outros, participam desse sistema bloqueando a ação dos radicais livres, envolvidos na oxigenização de ácidos graxos poliinsaturados, e conseqüentemente, na formação de peróxidos (ARAÚJO, 2001).

Segundo ARAÚJO (2001) o radical livre que é produzido no interior hidrofóbico da membrana combina com o oxigênio que lá se encontra dissolvido, formando o radical peroxil. O radical resultante ataca as proteínas e oxida novamente os ácidos graxos poliinsaturados adjacentes. Os hidroperóxidos, formados pela oxidação, por serem mais hidrofílicos, migram para a superfície da membrana para interagir com a água, provocando sua ruptura e alterando sua fluidez. A proteção da membrana é alcançada por meio dos seguintes mecanismos; remoção dos radicais livres, sendo que nas membranas, o principal removedor é o  $\alpha$ -tocoferol. Os tocoferóis removem os radicais peroxil antes que estes venham a oxidar os ácidos graxos adjacentes ou as proteínas. O grupo hidroxila presente no tocoferol doa seu átomo de hidrogênio para o radical peroxil, convertendo-o em peróxido. Desta forma as enzimas atuarão para a remoção dos novos radicais formados.

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

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 peroxil, e ou, pela formação do complexo antioxidante-peroxil. 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 o nível 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- $\alpha$ -tocoferol, sendo a forma  $\gamma$  a menos ativa (BOOTH e MCDONALD, 1992; SWENSON et al., 1996).

Os tocoferóis ou vitamina E tem como função a manutenção da integridade e da funcionalidade dos sistemas reprodutivo, muscular, circulatório, nervoso e imune. Algumas dessas funções podem ser realizadas inteiramente ou parcialmente pelo selênio ou certos antioxidantes sintéticos. Ela também está relacionada a reações normais de fosforilação (ATP); proteção das vitaminas A e C contra oxidação; síntese de ubiquinona; metabolismo de aminoácidos sulfurosos; metabolismo de vitamina B<sub>12</sub>, sendo que a deficiência afeta a conversão da vitamina em coenzima (injúrias neurológicas); metabolismo da vitamina D no fígado e rins, sendo que a deficiência reduz a atividade das hidroxilases.

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

No plasma, a vitamina E liga-se a lipoproteínas, sendo carregada ao fígado que a devolve para circulação ligada ao colesterol LDL.

Em tecidos, sugere-se que o tocoferol esteja presente na dupla camada lipídica de membranas celulares. Supõe-se que a cadeia lateral do tocoferol mistura-se com os ácidos graxos de cadeia longa com o núcleo cromado na superfície da membrana celular (BOOTH e MCDONALD, 1992). Neste local, o tocoferol atua como antioxidante para proteger a membrana celular dos efeitos nocivos de radicais livres. 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).

A ação do tocoferol como antioxidante é suplementada pela presença de glutathiona-peroxidase no componente solúvel da célula. A glutathiona-peroxidase

cataliza a conversão de peróxidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio em álcoois ou água, evitando assim que os peróxidos lesem componentes celulares. A glutathiona-peroxidase contém selênio como elemento de seu local ativo e constitui uma explicação das observações de que o selênio é eficaz na prevenção de algumas das condições de deficiência que também são evitadas pelo tocoferol (SWENSON et al., 1996). Assim, o selênio atua como estoque adicional de vitamina E, retardando os sinais de deficiência desta vitamina.

Segundo SEOUNGSOO e NOHYOUNG, (2000) a utilização de Selênio melhorou a viabilidade e motilidade espermática das amostras analisadas. Por sua vez, a adição de superóxido dismutase (SOD) no diluente causou redução nos níveis de capacitação espermática, indicando que ânions superóxidos podem despolarizar membranas celulares e desta forma modular a interação entre gradientes iônicos e funções celulares (SCOTT, 1973).

Antioxidantes químicos não são efetivos como a vitamina E, pois não são estocados no corpo do animal (MCDOWELL et al., 2000). Foi verificado que depois de uma determinada quantidade de suplementação não há incremento da desintoxicação de radicas livres.

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 espermatozóides bovinos criopreservados (BECONI et al., 1993). Porém, O'FLAHERTY et al., (1997) não obtiveram modificações nos parâmetros de viabilidade espermática após o descongelamento de sêmen contendo vitamina E.

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

Já o ácido ascórbico primeiramente ocorre em duas formas, chamada de ácido ascórbico reduzido e ácido dehidroascórbico oxidado, essa oxidação ocorre tão rápido, de forma que a vitamina C protege outros compostos contra oxidação. A oxidação-redução reversível do ácido ascórbico com ácido dehidroascórbico é a propriedade química mais importante da vitamina C (MCDOWELL et al., 2000).

O radical tocoferol formado pela oxidação da vitamina E é regenerado pela vitamina C, sendo o ácido ascórbico solúvel em água, este mecanismo pressupõe que o radical tocoferol se mova através da membrana até a superfície, para ser então reduzido pelo ácido ascórbico. Dessa interação ocorre formação do radical ascorbato (muito pouco reativo) e dois destes podem interagir com o NADH, regenerando o ascorbato. Deste modo a vitamina C é um antioxidante sinérgico a vitamina E (BUETTNER, 1993; ARAÚJO, 2001).

## **2.5. Diluentes e Crioprotetores**

Os meios diluidores são constituídos de substâncias que permitem 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).

Muitos estudos tem sido realizados na tentativa de desenvolver um meio que atenda todas essas qualidades, fazendo com que o mínimo de espermatozóides sejam perdidos no processo de criopreservação.

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 diluente 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

diluentes 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 fosfolípides, como a fosfatidilcolina (lecitina), possui ação protetora sobre membranas celulares. Em função de ocorrer uma interação dos fosfolipídios 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).

Pesquisas sobre antagonistas a criopreservação presentes na gema do ovo e a simplificação das técnicas para obtenção das lipoproteínas de baixa densidade reforçam que essas LDL seriam responsáveis pela resistência dos espermatozóides ao choque térmico devido à capacidade dessa fração de estabilizar e manter a integridade das membranas celulares (QUINN et al., 1980; WATSON, 1981; MOUSSA et al., 2002). Adicionalmente, a presença dos fosfolipídios da gema de ovo evita o aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular durante o resfriamento do sêmen, permitindo que as membranas não sofram disfunções e morte celulares (WATSON, 1981; AMANN e PICKETT, 1987).

A concentração da gema de ovo, também é fator importante que deve diferir entre espécies, mas normalmente varia entre três a 25%, mais especificamente para bovinos, varia de 10 a 25%.

A utilização de substâncias emulsificantes, como Equex (Equex STM Paste), tendo como princípio ativo o dodecil-sulfato de sódio, têm sido adicionado ao meio diluidor, principalmente de cães e eqüinos, pois aumenta a capacidade protetora dos fosfolipídios da gema de ovo por deixá-los mais disponíveis, protegendo a membrana plasmática dos espermatozóides contra choque térmico e danos do congelamento

(THOMAS et al., 1992; ROTA et al., 1999; PEÑA e LINDE-FORSBERG, 2000; PEÑA et al., 2002). A concentração utilizada no diluente recomendada pelo fabricante está entre 0,5 a 1%. PEÑA et al. (2002) verificaram que a adição do dodecil-sulfato de sódio aumentou o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , mas não interferiu na capacitação e reação acrossomal.

Com o objetivo de manter sempre a integridade da membrana e aumentar a viabilidade espermática, experimentos utilizando antioxidantes (vitamina E, vitamina C, catalase, superóxido dismutase, entre outros), como componente do diluente, 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 BALL et al., 2001), sendo que os mesmos inibem ou diminuem a produção de radicais livres, mas algumas vezes não interferem 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, congelamento e descongelamento, 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 algumas concentrações (FAHY, 1986).

O glicerol, um álcool polihídrico altamente permeável, é o crioprotetor mais empregado no congelamento de sêmen nas diferentes espécies. Sua concentração ótima pode ser influenciada por outros componentes do diluente, além da curva de resfriamento, e protocolo de congelamento e descongelamento. Contudo o fator determinante está relacionado com a espécie, embora seu efeito tóxico sobre os espermatozóides seja observado em algumas concentrações, levando a perda da capacidade de fertilizar, o que pode ser restaurado quando o mesmo é removido (HOLT, 2000).

O mecanismo exato pelo qual o glicerol protege as células não está completamente elucidado (PARKS e GRAHAM, 1992). No entanto, AMANN e PICKETT (1987) sugerem que o maior efeito do glicerol é extracelular, pois ao se



ligar à água, diminui o ponto de congelação das soluções, aumentando a quantidade de água não congelada, permitindo que a célula se desidrate mais lentamente e, conseqüentemente, reduz a concentração de soluto no líquido residual. O glicerol reduz também a fluidez da membrana e ainda facilita o rearranjo de sua estrutura (PARKS e GRAHAM, 1992). HOLT (2000) relata que no momento em que o glicerol alcança o interior da célula provavelmente modifica a viscosidade citoplasmática provocando alterações em todos os processos de difusão celular. O glicerol poderia ainda alterar o estado bioenergético dos espermatozóides interferindo no balanço entre a síntese e a utilização do ATP.

O glicerol pode ser mais deletério aos espermatozóides durante o processo de descongelamento que no congelamento. Durante o resfriamento, o glicerol entra nas células e no descongelamento se move das células para o meio extracelular. Quando a permeabilidade da membrana plasmática é insuficiente para permitir esse movimento, o resultado é lesão permanente (AMANN e PICKETT, 1987).

## **2.6. Criopreservação Espermática**

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 do congelamento. 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 congelamento é de extrema importância na manutenção da integridade celular, pois se a mesma é muito 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 congelamento 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 o congelamento, também ocorrem danos durante o processo de reaquecimento da célula após o descongelamento, 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 descongelamento é tão importante quanto a congelação para a sobrevivência da célula. O protocolo de descongelamento preconizado para bovinos é de 37°C, por no mínimo 30 segundos, para palhetas de 0,5ml (ASBIA).

## **2.7. 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 ovócitos, 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 intactas, necessárias para a penetração dos espermatozóides através das estruturas que circundam o ovócito; proteínas da membrana plasmática, importante para a sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino e para a junção dos mesmos ao ovócito 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).

Desta forma, métodos concretos de avaliação do sêmen pós-descongelamento, bem como sua viabilidade, possuem significado econômico (FAZELI et al., 1997; RODRIGUEZ MARTINEZ et al., 1997).

### **2.7.1. 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 antigas para prever a qualidade seminal a campo. Segundo o autor, estes parâmetros são de grande importância e podem revelar, por si só, a existência de distúrbios bioquímicos no sêmen, associados ou não com alterações da espermiogênese. Entretanto, STOLHAMAR 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 (1927) citados por vários autores que avaliaram sêmen bovino tanto a fresco 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).

### 2.7.2. 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 estabelecidos 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.

### 2.7.3. Teste Hiposmótico

O teste hiposmótico (HO) 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., 1997; ROTA et al., 1999).

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., 1999).

O teste hiposmótico é simples, barato e aplicável juntamente com os exames de rotina utilizados para avaliar a fertilidade de touros e os danos em membrana dos espermatozóides, ocasionados pelo processo de criopresevação (CORREA e ZAVOS, 1994).

#### **2.7.4. Teste de 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; ZÚCCARI, 1998; AZERÊDO, 1999; SOUZA, 2001; OLIVEIRA, 2003; SANTOS, 2003).

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 espermatozóides íntegros é visualizado pela coloração verde fluorescente, já as células espermáticas que apresentam lesões na membrana plasmática podem ser coradas de vermelho pelo IP, que é corante de DNA, sendo impermeável à membrana íntegra.

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 espermatozóides férteis não são avaliadas por único método de avaliação (SIKKA, 1996; BUENO, 2000).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

As coletas de sêmen foram realizadas na Central de Inseminação Artificial Yakult, em Bragança Paulista – SP e as análises laboratoriais no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – MG e na Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Os animais foram selecionados conforme sua disponibilidade na escala de produção de sêmen pela Central e quanto à qualidade de congelamento do sêmen. Os touros foram submetidos a exame andrológico, com inspeção e palpação dos órgãos genitais externos e glândulas anexas sendo empregado neste estudo, após aprovação nos referidos exames.

Os touros permaneceram isolados em piquetes individuais de aproximadamente 100 metros quadrados, com pastagem predominante de capim coast-cross (*Cynodon dactylum*), suplementados com 17 Kg de silagem de milho, 2,5 Kg de ração e 5 a 7 Kg de feno (dieta para animais de 1000 a 1100 Kg) uma vez ao dia, e água fresca e sal mineral *ad libitum*.

#### 3.1. Coleta de Sêmen

Foram utilizados três touros da raça Nelore, com idade variando de quatro a seis anos, utilizados na rotina de coleta da central, sendo coletado seis ejaculados por touro, totalizando 18 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 sempre pelo mesmo técnico.

Para recepção dos ejaculados nas coletas foram utilizados tubos coletores

graduados de vidro, 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 37°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. A coloração e o aspecto do ejaculado foram avaliados por meio de análise subjetiva e classificado segundo MIES FILHO et al. (1982) em coloração igual marfim e aspecto: aquoso, opalescente, leitoso e cremoso.

### **3.2. Aspectos Físicos e Morfológicos do Sêmen**

Para avaliação das características de turbilhonamento, motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático, 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 de sêmen 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 do espectrofotômetro (marca - IMV, modelo – Fotômetro Accucell) onde 3,6 ml de solução fisiológica e 0,04 mL de sêmen foram colocados em uma cubeta, diluídas na proporção de 1:100, para a devida leitura, após ligeira homogeneização.

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 espermatozóides normais e de anomalias de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda (BLOMM, 1973). Posteriormente, os defeitos foram classificados de acordo com HENRY e NEVES (1998).



### 3.3. Meios Diluidores de Criopreservação

Neste experimento o diluidor utilizado foi o TRIS modificado (ROBERTS e FOOTE, 1987). (Tabela 1)

Tabela 1. Composição do meio diluidor – TRIS modificado

| COMPONENTE                     | QUANTIDADE |
|--------------------------------|------------|
| Tris (Hidroximetilaminometano) | 2,42g      |
| Ácido cítrico monohidratado    | 1,50g      |
| Glicose                        | 1,25g      |
| Gema de ovo                    | 20Ml       |
| Glicerol                       | 6,0mL      |
| Estreptomicina                 | 0,0134g    |
| Água tridestilada (qsp)        | 100mL      |

Fonte: Roberts e Foote (1987)

Após a coleta das amostras de sêmen e das avaliações físicas do mesmo, os ejaculados foram divididos em cinco frações iguais, sendo cada uma delas diluída na proporção inicial de 1:1, com o diluente controle, ou seja, o meio Tris. O equex e os antioxidantes foram acrescentados somente na diluição final.

Os cinco tratamentos foram:

Tratamento 1- Controle (Tris-modificado);

Tratamento 2- Controle + Equex;

Tratamento 3- Controle + Vitamina E + Equex;

Tratamento 4- Controle + Vitamina C;

Tratamento 5- Controle + Vitamina E + Equex + Vitamina C.

O equex estava presente nos tratamentos em que havia vitamina E, pois foi o emulsificador do tocoferol no diluente, sendo que essa vitamina é lipossolúvel.

O tratamento 2 foi realizado somente com a adição do equex para que servisse de controle em relação a adição do detergente associado com a vitamina E.

#### 3.3.1. Preparação das Soluções Estoques

Equex (STM paste) princípio ativo, dodecil-sulfato de sódio

Com auxílio de uma seringa de insulina foi coletado 0,8mL de equex sendo em seguida diluído em 100mL de água tridestilada. Dessa solução, 50mL foi reservado para a adição posterior de Vitamina E e os outros 50mL foram acondicionados e congelados

a -20°C em *eppendorfs* de 1mL até sua utilização.

#### Vitamina E (acetato de $\alpha$ -tocoferol – Sigma)

Uma concentração de 10mM de vitamina foi diluída em 50mL da solução preparada de Equex. A homogeneização foi intensa, porém, cuidadosa para que bolhas não fossem formadas.

Estas soluções estoques foram preparadas ao abrigo da luz, armazenadas, e congeladas a -20°C, em *eppendorfs* de 1mL e após o descongelamento de cada amostra, a solução restante era descartada, devido ao manuseio e ao aquecimento em banho-maria a 37°C. Sendo a vitamina fotossensível e reativa ao oxigênio, para sua pesagem, utilizou-se local escuro e o mínimo de contato com o ar.

### 3.3.2. 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 50 milhões de espermatozóides para a palheta de acetato de polietileno de 0,5mL, para todos os tratamentos. Essa concentração foi fixada com objetivo de facilitar os cálculos.

A vitamina E e o equex foram adicionados e homogeneizados aos diluidores e acrescentados nas diluições finais, sendo fixado em 10 $\mu$ L para cada 100 x 10<sup>6</sup> espermatozóides por mL, para ambos componentes. O cálculo foi realizado do seguinte modo:

|                                     |   |                        |   |                             |
|-------------------------------------|---|------------------------|---|-----------------------------|
| Concentração de<br>Sptzs móveis/ mL | X | volume do<br>ejaculado | ÷ | 100 x 10 <sup>6</sup> sptz; |
|-------------------------------------|---|------------------------|---|-----------------------------|

O resultado obtido multiplicado por dez corresponde ao total de vitamina e/ou equex em  $\mu$ L a adicionar na diluição final dos diluidores (tratamento 2, 3 e 5).

A vitamina C (Ácido ascórbico – Sigma) também foi adicionada e homogeneizada ao diluidor e acrescentada na diluição final na quantidade de 0,45mg/mL (tratamento 4 e 5) (UPRETI et al., 1997; BALL et al., 2001).

Após a diluição final, cada tratamento que já se encontrava acondicionado em tudo de ensaio, era agrupado em um recipiente de plástico que continha água a 37°C. A quantidade de água variava com a quantidade de sêmen diluído, mas de modo geral, o volume de água era a metade ou um pouco mais da metade do volume de sêmen diluído.

Os tratamentos acondicionados nesse banho-maria eram levados para câmara fria, a qual encontrava-se a 2°C. Todo o procedimento inicial do sêmen expendeu, no máximo, 30 minutos, até que o sêmen fosse coletado e submetido ao resfriamento.

### **3.4. Resfriamento, Congelamento e Descongelamento**

Os tubos 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 manualmente e congelados. A curva de resfriamento foi de aproximadamente 0,55°C/minuto.

A congelação foi realizada pelo minidigitcool, um aparelho computadorizado (marca - IMV, modelo – 1400 3T), com capacidade para congelar 1392 doses por vez e programado para fazer uma curva que levava um tempo de oito minutos para chegar de 4°C a - 140°C (a curva não foi revelada pela empresa). Percorrido este período, a máquina sinalizava quando a palheta testemunha estava a - 140°C, e em seguida, a própria máquina, desligava a hélice do aparelho, e após cinco minutos, tempo para a estabilização do nitrogênio e segurança da parada da hélice, 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. As palhetas de sêmen foram mantidas criopreservadas até o momento de sua utilização.

O descongelamento do sêmen foi realizado em banho-maria a 37°C, por no mínimo 30 segundos. Após o descongelamento da palheta o sêmen foi transferido para frascos *ependorf* de 1,5 mL, previamente aquecidos em banho-maria a mesma temperatura, foram mantidos incubados a 37°C para serem avaliados. O descongelamento foi feito entre três semanas até, aproximadamente, seis semanas após o congelamento.

### **3.5. Testes Complementares**

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

### 3.5.1. Teste de Termo-Resistência Lento

A longevidade dos espermatozóides foi avaliada pelo teste de termo-resistência lento nas amostras de cada partida de sêmen dos touros utilizados neste experimento. Logo após a coleta, a diluição e o descongelamento para cada tratamento. O teste consistiu em colocar uma amostra de sêmen de 0,5 mL, em um frasco de *ependorf* de 1,5 mL, e submetê-las a incubação a 37°C, durante três horas e a cada 60 minutos foram avaliadas quanto a motilidade progressiva retilínea e vigor espermáticos de acordo com DIMITROPOULOS (1967) modificado.

### 3.5.2. Teste Hiposmótico

A integridade da membrana plasmática foi avaliada logo após a coleta, a diluição e o descongelamento 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. O resultado foi determinado em porcentagem, sendo o cálculo realizado pela seguinte fórmula:

$$\text{HO (\%)} = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda dos espermatozóides antes do teste HO}) \text{ (REVELL e MRODE, 1994).}$$

### 3.5.3. 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 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).

Uma palheta de cada ejaculado congelado foi avaliada após o descongelamento a 37°C, por no mínimo 30 segundos. Amostras de 10µL de sêmen foram adicionadas a 40µL de solução trabalho, que se encontrava a temperatura ambiente e em *eppendorfs* 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, 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 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.

O fluxograma de todo procedimento desde a coleta até avaliação do sêmen após o descongelamento encontra-se sumariado em anexo 3.

### 3.6. Análise Estatística

Para realização das análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico SAEG (UFV, 1997).

Para todas características estudadas foi utilizada a estatística descritiva (média, desvio padrão e amplitude).

As características quantitativas foram submetidas aos testes de normalidade e homocedasticidade, à Análise de Variância (ANOVA), sendo que as médias que apresentaram significância pelo teste F, foram submetidas às comparações de médias

pelo teste de Tuckey, com probabilidade de erro de 5%.

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

Os testes não-paramétricos foram utilizados para análise do vigor espermático, nos diferentes tratamentos, e avaliados pelo teste de Wilcoxon.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Características Físicas e Morfológicas do Sêmen *in natura* e diluído

Na Tabela 2 encontram-se os valores médios e desvio padrão das características de volume, concentração, turbilhonamento, motilidade espermática progressiva retilínea, vigor, defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais e células espermáticas reativas ao teste hiposmótico do sêmen *in natura* coletado dos três touros utilizados neste experimento.

O volume médio encontrado foi de  $5,40 \pm 1,12$  mL, e a concentração espermática média foi de  $1,27 \pm 0,48 \times 10^9$  espermatozóides/mL não havendo variação entre os ejaculados dos touros ( $p > 0,05$ ). Os valores médios de turbilhonamento, motilidade e vigor espermático também não apresentaram variação ( $p > 0,05$ ) sendo  $2,47 \pm 0,63$ ,  $78,05 \pm 3,89\%$ ,  $3,83 \pm 0,30$ , respectivamente. A porcentagem de espermatozóides normais foi de  $82,89 \pm 7,95\%$ , variando entre 81,58% e 85,42%, não houve diferença entre animais e coletas ( $p > 0,05$ ). Não se observou, em nenhuma das amostras avaliadas, a presença de hemácias, leucócitos, medusas, ou tipos celulares da linhagem espermatogênica. Em relação aos espermatozóides reativos ao teste hiposmótico, ou seja, aos normais, a média foi de  $52,44 \pm 18,30\%$ .

O aspecto e o odor dos ejaculados mostraram-se semelhantes entre as coletas, sendo o aspecto leitoso ou cremoso e o odor do ejaculado *sui generis*.

Todas as características observadas encontram-se dentro dos padrões de normalidade para espécie, preconizadas pelo Ministério de Agricultura e Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (HENRY e NEVES, 1998).

A correlação de defeitos totais com defeitos menores foi  $r = 0,89$  e a correlação de defeitos totais com defeitos maiores foi  $r = 0,72$  ( $p < 0,05$ ). Devido ao choque

térmico que ocorreu em duas coletas com os três animais o número de defeitos menores aumentou. Esse choque foi ocasionado pelo aquecimento inadequado do banho-maria, devido à falta de energia.

A avaliação morfológica (defeitos de cabeça, acrossoma e cauda) não foi realizada após o descongelamento, visto que, outros trabalhos verificaram não ocorrer diferença significativa após o processamento do sêmen. O processo de peroxidação lipídica induz alterações estruturais, principalmente nas membranas dos espermatozóides, e alterações metabólicas, ocasionando rápida e irreversível perda da motilidade espermática, e aumento da taxa de liberação de componentes intracelulares (JONES e MANN, 1977). Por isso a adição de antioxidantes aos diluentes não afetaria a avaliação morfológica e outros testes complementares auxiliaram na detecção da lesão estrutural.

Tabela 2. Características físicas e morfológicas do sêmen *in natura* e células reativas ao teste hiposmótico de touros da raça Nelore, mantidos em regime de coleta em Central de Inseminação

| Características      | Touro 1                    | Touro 2                    | Touro 3                    | Média         |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------|
| VOL (mL)             | 5,17 ± 1,04 <sup>a</sup>   | 5,53 ± 1,26 <sup>a</sup>   | 5,50 ± 1,21 <sup>a</sup>   | 5,40 ± 1,12   |
| CONC/10 <sup>9</sup> | 1,37 ± 0,41 <sup>a</sup>   | 1,09 ± 0,17 <sup>a</sup>   | 1,34 ± 0,73 <sup>a</sup>   | 1,27 ± 0,48   |
| TURB (0-5)           | 2,75 ± 0,96 <sup>a</sup>   | 2,33 ± 0,26 <sup>a</sup>   | 2,33 ± 0,82 <sup>a</sup>   | 2,47 ± 0,63   |
| MOT (0-100)          | 79,16 ± 2,04 <sup>a</sup>  | 80,00 ± 3,16 <sup>a</sup>  | 75,00 ± 4,47 <sup>a</sup>  | 78,05 ± 3,89  |
| VIG (0-5)            | 3,91 ± 0,20 <sup>a</sup>   | 3,91 ± 0,20 <sup>a</sup>   | 3,67 ± 0,41 <sup>a</sup>   | 3,83 ± 0,30   |
| DMA (%)              | 6,92 ± 4,08 <sup>a</sup>   | 7,92 ± 2,46 <sup>a</sup>   | 8,08 ± 5,28 <sup>a</sup>   | 7,64 ± 3,89   |
| DME (%)              | 11,42 ± 7,64 <sup>a</sup>  | 6,67 ± 5,66 <sup>a</sup>   | 10,17 ± 3,25 <sup>a</sup>  | 9,42 ± 5,83   |
| DT (%)               | 18,33 ± 9,61 <sup>a</sup>  | 14,58 ± 7,84 <sup>a</sup>  | 18,42 ± 7,01 <sup>a</sup>  | 17,11 ± 7,95  |
| HO (%)               | 44,83 ± 20,80 <sup>a</sup> | 63,00 ± 19,54 <sup>a</sup> | 49,50 ± 10,52 <sup>a</sup> | 52,44 ± 18,30 |

VOL = volume do ejaculado; CONC/10<sup>9</sup> = concentração espermática em mL de ejaculado em milhões; TURB = turbilhonamento; MOT = motilidade espermática progressiva retilínea; VIG = vigor espermático; DMA = defeito espermático maior; DME = defeito espermático menor; DT = defeito espermático total; HO = percentual de espermatozóides normais no teste hiposmótico.

Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ), pelo Teste de Tuckey.



#### 4.2. Teste de Termo-resistência em Sêmen Diluído e Congelado/Descongelado

Os valores médios da motilidade espermática progressiva retilínea e do vigor espermático observado durante o teste de termo-resistência no sêmen diluído e não congelado estão sumariados na Tabela 3 e 4, respectivamente. Não houve diferença da motilidade espermática progressiva entre os diversos tipos de diluidores (Fig.1), porém quando os tratamentos foram comparados com o sêmen *in natura*, ou seja, sêmen sem diluente, a motilidade foi maior no sêmen *in natura* ( $p < 0,05$ ). Tal diferença pode ser explicada pelo fato da análise do TTR no tempo zero, para sêmen diluído nos tratamentos, ter sido realizada após 30 minutos, tempo este, despendido desde a coleta do sêmen até que o mesmo fosse submetido ao resfriamento, além da eficiência do meio diluidor. A motilidade é um processo que requer maior demanda de energia e apresenta correlação positiva com a demanda de ATP, cuja síntese está associada a capacidade funcional das mitocôndrias, sendo este estoque de energia consumido pelos espermatozóides durante o período de incubação.

Para os valores médios do vigor espermático foi observada diferença entre os tratamentos 1 e 5 nos tempos 120 e 180 minutos de incubação, sendo as médias  $3,08 \pm 0,35$  e  $3,44 \pm 0,42$  no tempo 120, e  $2,97 \pm 0,36$  e  $3,28 \pm 0,31$  no tempo 180 minutos, para os tratamentos 1 e 5 respectivamente. Verificou-se que houve proteção do diluente no tratamento 5 sobre o vigor espermático em relação ao tempo de incubação, visto que, na primeira hora não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 4).

O mecanismo de lesão celular durante o período de incubação está relacionado, principalmente, ao processo de senescência celular. As mudanças físico-químicas que ocorrem durante a estocagem *in vitro* são irreversíveis e os danos decorrentes são a instabilidade nuclear, lesão da membrana, perda de componente intracelular, queda da motilidade e peroxidação lipídica (ZÚCCARI, 1998).

Como os antioxidantes proporcionam estabilização da membrana espermática, esperá-se que mantenham a viabilidade do sêmen por mais tempo, ou seja, mantenham integridade dos componentes estruturais e do metabolismo dos espermatozóides. Assim, características como motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático, observadas pelo TTR, apresentariam maior longevidade.

Tabela 3. Percentual médio da motilidade espermática progressiva retilínea no teste de termo-resistência (TTR) do sêmen bovino, diluído e não congelado em diferentes meios diluidores de criopreservação

| Tratamento           | TTR (min)                 |                           |                           |                           |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                      | 0                         | 60                        | 120                       | 180                       |
| <i>In natura</i> (%) | 78,05 ± 3,89 <sup>a</sup> | -                         | -                         | -                         |
| T1                   | 75,00 ± 6,64 <sup>b</sup> | 71,39 ± 5,89 <sup>b</sup> | 67,50 ± 6,70 <sup>b</sup> | 62,50 ± 7,52 <sup>b</sup> |
| T2                   | 75,28 ± 6,29 <sup>b</sup> | 72,22 ± 6,69 <sup>b</sup> | 68,05 ± 6,67 <sup>b</sup> | 63,89 ± 8,50 <sup>b</sup> |
| T3                   | 75,28 ± 7,95 <sup>b</sup> | 71,67 ± 7,07 <sup>b</sup> | 69,17 ± 6,91 <sup>b</sup> | 65,83 ± 7,52 <sup>b</sup> |
| T4                   | 75,26 ± 5,81 <sup>b</sup> | 70,28 ± 6,96 <sup>b</sup> | 67,50 ± 6,47 <sup>b</sup> | 63,89 ± 8,14 <sup>b</sup> |
| T5                   | 74,44 ± 8,02 <sup>b</sup> | 71,39 ± 7,44 <sup>b</sup> | 68,61 ± 7,03 <sup>b</sup> | 64,44 ± 8,20 <sup>b</sup> |

T1 = Tris (controle); T2 = Tris, com equex; T3 = Tris, com vitamina E + equex; T4 = Tris, com vitamina C; T5 = Tris, com vitamina E + equex e vitamina C.

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Tuckey.

Tabela 4. Média do vigor espermático (0-5) no teste de termo-resistência (TTR) no sêmen bovino, diluído e não congelado em diferentes meios diluidores de criopreservação

| Tratamento       | TTR (min)                |                          |                           |                           |
|------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                  | 0                        | 60                       | 120                       | 180                       |
| <i>In natura</i> | 3,83 ± 0,30              | -                        | -                         | -                         |
| T1               | 3,44 ± 0,34 <sup>a</sup> | 3,30 ± 0,30 <sup>a</sup> | 3,08 ± 0,35 <sup>b</sup>  | 2,97 ± 0,36 <sup>b</sup>  |
| T2               | 3,58 ± 0,43 <sup>a</sup> | 3,33 ± 0,42 <sup>a</sup> | 3,19 ± 0,39 <sup>ab</sup> | 3,08 ± 0,35 <sup>ab</sup> |
| T3               | 3,75 ± 0,43 <sup>a</sup> | 3,50 ± 0,42 <sup>a</sup> | 3,36 ± 0,41 <sup>ab</sup> | 3,19 ± 0,42 <sup>ab</sup> |
| T4               | 3,69 ± 0,55 <sup>a</sup> | 3,44 ± 0,51 <sup>a</sup> | 3,39 ± 0,50 <sup>ab</sup> | 3,22 ± 0,43 <sup>ab</sup> |
| T5               | 3,67 ± 0,45 <sup>a</sup> | 3,47 ± 0,44 <sup>a</sup> | 3,44 ± 0,42 <sup>a</sup>  | 3,28 ± 0,31 <sup>a</sup>  |

T1 = Tris (controle); T2 = Tris, com equex; T3 = Tris, com vitamina E + equex; T4 = Tris, com vitamina C; T5 = Tris, com vitamina E + equex e vitamina C.

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Wilcoxon.

Os valores médios da motilidade progressiva retilínea e do vigor espermático pós-descongelamento avaliados pelo teste de termo-resistência estão sumariados na Tabela 5 e 6. Os valores apresentados na Tabela 5 indicam não ter ocorrido diferença da motilidade espermática progressiva retilínea entre tratamentos ( $p > 0,05$ ) (Fig.1).

Tabela 5. Média percentual da motilidade espermática progressiva retilínea após descongelamento no teste de termo-resistência (TTR) de sêmen bovino, diluído em diferentes meios de criopreservação

| Tratamento | TTR (min)                  |                            |                            |                            |
|------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|            | 0                          | 60                         | 120                        | 180                        |
| T1         | 56,94 ± 10,02 <sup>a</sup> | 54,72 ± 10,00 <sup>a</sup> | 51,80 ± 11,78 <sup>a</sup> | 47,22 ± 13,65 <sup>a</sup> |
| T2         | 57,36 ± 10,10 <sup>a</sup> | 55,55 ± 10,81 <sup>a</sup> | 52,78 ± 12,39 <sup>a</sup> | 48,61 ± 13,18 <sup>a</sup> |
| T3         | 57,06 ± 10,91 <sup>a</sup> | 55,14 ± 11,56 <sup>a</sup> | 51,80 ± 13,10 <sup>a</sup> | 48,05 ± 16,38 <sup>a</sup> |
| T4         | 57,64 ± 8,98 <sup>a</sup>  | 55,97 ± 9,55 <sup>a</sup>  | 53,19 ± 9,65 <sup>a</sup>  | 50,69 ± 12,02 <sup>a</sup> |
| T5         | 55,69 ± 8,79 <sup>a</sup>  | 54,17 ± 8,15 <sup>a</sup>  | 52,22 ± 8,82 <sup>a</sup>  | 50,42 ± 9,95 <sup>a</sup>  |

T1 = Tris (controle); T2 = Tris, com equex; T3 = Tris, com vitamina E + equex; T4 = Tris, com vitamina C; T5 = Tris, com vitamina E + equex e vitamina C.

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ), pelo Teste de Tuckey.

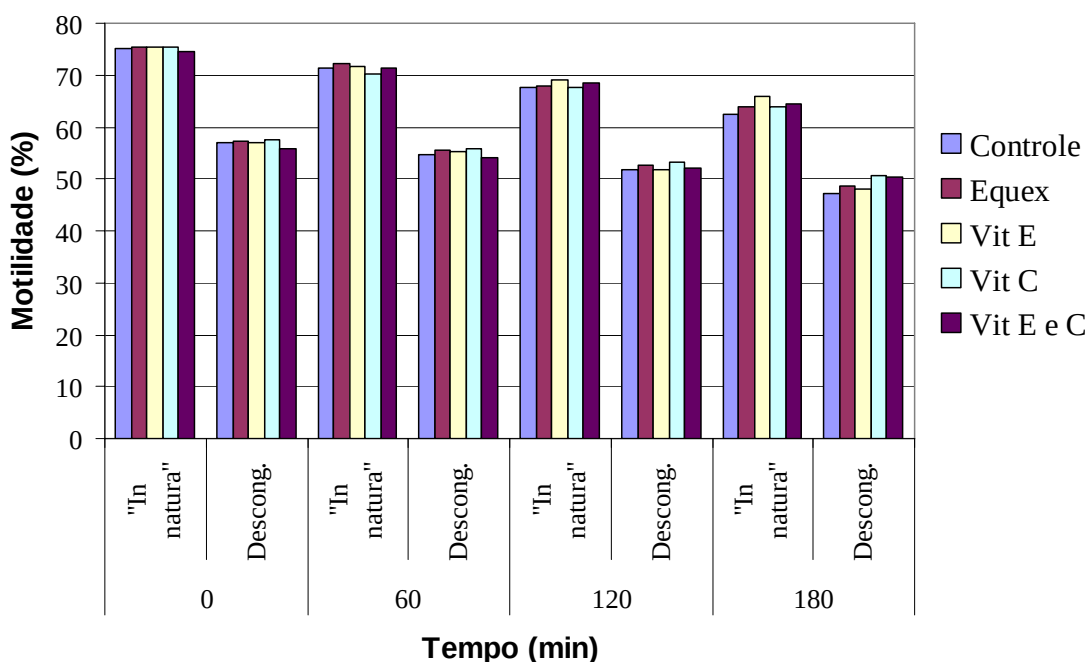


Fig.1 Motilidade espermática progressiva retilínea de sêmen bovino *in natura* e pós-descongelado, diluídos em diferentes meios de criopreservação durante o teste de termo-resistência

A adição dos antioxidantes (vitamina E e vitamina C) e o equex, não melhorou a motilidade espermática progressiva retilínea ( $p > 0,05$ ), (Tabela 5 e Fig. 1). Estes dados estão de acordo com UPRETI et al. (1997), AURICH e SCHONHERR (1997) e BALL et al. (2001) que não observaram melhora na manutenção da motilidade espermática com a utilização destes mesmos antioxidantes, trabalhando com sêmen resfriado de ovino e eqüino, respectivamente, utilizando diluente à

base de leite. Entretanto, AGUERO et al. (1995) verificaram melhora da motilidade e viabilidade espermática durante 24 horas de estocagem de sêmen resfriado de garanhão com adição da vitamina E.

Neste experimento foi observado, por meio do teste de termo-resistência, melhor manutenção do vigor espermático para o tratamento 5, em todos os momentos em relação ao meio Tris (Tabela 6 e Fig. 2), sugerindo que houve sinergismo entre os antioxidantes e o dodecil sulfato de sódio (equex) no meio diluidor melhorando a manutenção da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides refletindo no aumento da viabilidade espermática.

ARRIOLA e FOOTE (1987) sugeriram que o efeito protetor do equex é mediado pela solubilização de protetores lipídios presentes na gema de ovo exercendo efeito positivo indireto na membrana plasmática dos espermatozóides, embora, PEÑA e LINDE-FORSBERG (2000) tenham observado efeito direto na membrana dos espermatozóides, com resposta negativa quando o detergente fora adicionado antes do período de equilíbrio quando comparado a adição de equex imediatamente antes do congelamento, supondo que o detergente conferiu fluidez excessiva à membrana espermática, aumentando a permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitiram a entrada de íons e pequenas moléculas, desestabilizando as membranas. Esses autores sugeriram que o efeito benéfico do equex é tempo e concentração dependente.

Apesar da adição do equex ter sido realizada em uma única etapa (antes do resfriamento) no presente estudo, não houve efeito negativo do mesmo na membrana plasmática. Pelo contrário, sua adição foi benéfica em relação a motilidade espermática progressiva retilínea (mesmo que a mesma não tenha variado;  $p > 0,05$ ), vigor espermático (para tratamento 1 e 5;  $p < 0,05$ ) e principalmente, integridade da membrana plasmática dos espermatozóides ( $p < 0,05$ ), no qual apresentam valores superiores quando comparados ao grupo controle (Tabelas 7 e 8). É válido ressaltar que o diluente utilizado pelos autores continham concentrações de glicerol e equex diferentes da concentração utilizada neste experimento, além do estudo ser em outra espécie.

Tabela 6. Média de vigor espermático (0-5) no teste de termo-resistência (TTR) após descongelamento do sêmen bovino, diluído em diferentes meios de criopreservação

| Tratamento | TTR (min)                 |                           |                           |                           |
|------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|            | 0                         | 60                        | 120                       | 180                       |
| T1         | 3,43 ± 0,24 <sup>b</sup>  | 3,39 ± 0,27 <sup>b</sup>  | 3,19 ± 0,40 <sup>b</sup>  | 3,00 ± 0,43 <sup>b</sup>  |
| T2         | 3,46 ± 0,28 <sup>ab</sup> | 3,37 ± 0,30 <sup>ab</sup> | 3,24 ± 0,33 <sup>ab</sup> | 3,03 ± 0,45 <sup>ab</sup> |
| T3         | 3,44 ± 0,26 <sup>ab</sup> | 3,36 ± 0,28 <sup>ab</sup> | 3,30 ± 0,36 <sup>ab</sup> | 3,07 ± 0,46 <sup>ab</sup> |
| T4         | 3,53 ± 0,24 <sup>ab</sup> | 3,43 ± 0,24 <sup>ab</sup> | 3,37 ± 0,25 <sup>ab</sup> | 3,19 ± 0,25 <sup>ab</sup> |
| T5         | 3,51 ± 0,14 <sup>a</sup>  | 3,51 ± 0,14 <sup>a</sup>  | 3,40 ± 0,23 <sup>a</sup>  | 3,22 ± 0,25 <sup>a</sup>  |

T1 = Tris (controle); T2 = Tris, com equex; T3 = Tris, com vitamina E + equex; T4 = Tris, com vitamina C; T5 = Tris, com vitamina E+ equex e vitamina C.

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Wilcoxon.

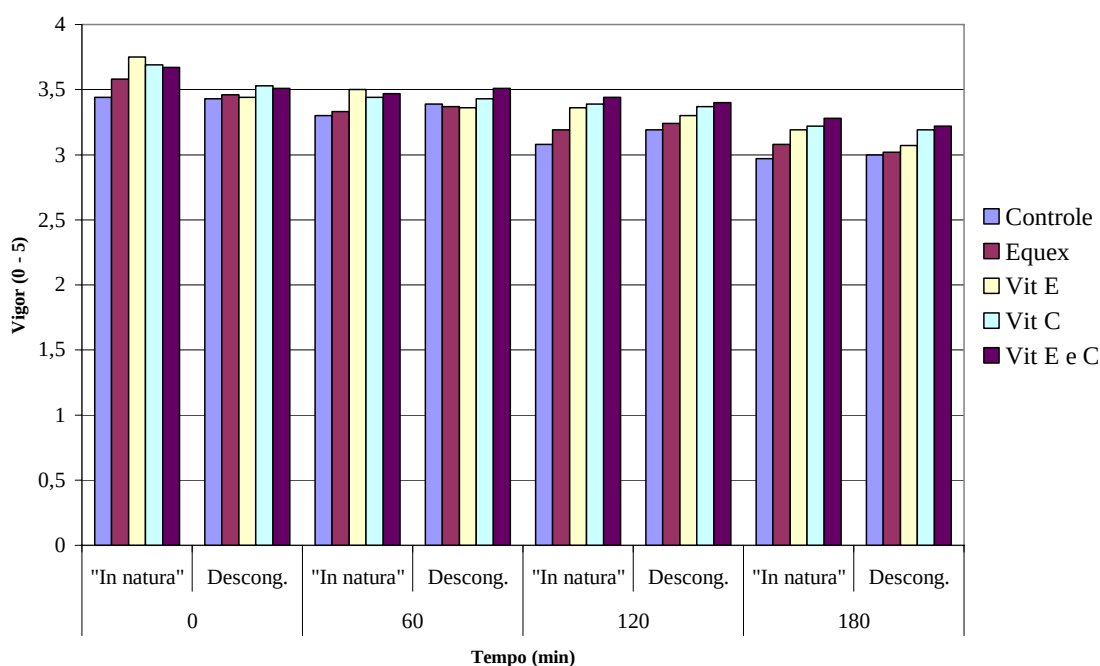


Fig.2. Vigor espermático de sêmen bovino *in natura* e descongelado, diluídos em diferentes meios de criopreservação, durante o teste de termo-resistência

#### 4.3. Teste Hiposmótico para Sêmen *in natura* e Congelado/Descongelado

O número de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico não diferiu entre tratamentos para sêmen pré ( $58,34 \pm 18,29$ ) e pós ( $30,54 \pm 10,92$ ) congelamento ( $p > 0,05$ ), estando as médias nos diferentes tratamentos sumariadas na Tabela 7 e Figura 3. Foi verificada uma queda de aproximadamente 48% no número de espermatozoides

reativos ao teste hiposmótico com o processo de congelamento. SANTOS (2003) observou uma queda de aproximadamente 55% no número de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico após a criopreservação de sêmen eqüino com diferentes diluentes. É durante o período de resfriamento que a membrana plasmática dos espermatozóides interagem com os componentes da gema do ovo adquirindo resistência ao choque térmico e ao congelamento/descongelamento, embora muitas células espermáticas não resistam as mudanças irreversíveis à membrana plasmática, tais como: desidratação dos espermatozóides, mudança da fase de transição dos fosfolipídios, formação de gelo intracelular, enrugamento e distensão da membrana em resposta a hiperosmolaridade, rearranjo estrutural (PARKS e GRAHAM, 1992).

A correlação encontrada entre teste hiposmótico e motilidade espermática progressiva retilínea no sêmen diluído em diferentes meios de criopreservação foi positiva e baixa ( $r=0,23$ ) concordando com os achados de BUENO (2000) e MARTINS (2001). Contudo, maior correlação com a motilidade espermática progressiva retilínea era esperada, embora a correlação do percentual de células reagidas ao hiposmótico com motilidade tenha sido maior após o descongelamento ( $r=0,37$ ). O vigor espermático que antes não havia apresentado correlação com o teste hiposmótico, após o descongelamento apresentou correlação de  $r=0,21$ , embora, seja considerado baixo.

Apesar de ocorrer correlação, observou-se diferença considerável entre os percentuais de células móveis (motilidade progressiva) (75,05 vs 56,94) e espermatozóides com membranas plasmáticas reativas ao teste hiposmótico (58,34 vs 30,54), antes e após o congelamento, respectivamente. Essa diferença foi observada por ZÚCCARI (1998) e FÜRST (2002) que trabalharam com sêmen eqüino, e foi explicada pelo choque térmico drástico que os espermatozóides sofrem, aliada à baixa resistência ao processo de criopreservação apresentado pela espécie.

Tais resultados nos levam a questionar a acurácia dos testes complementares *in vitro*, visto que o hiposmótico, por exemplo, na maioria dos trabalhos apresentam a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra baixa quando comparado com motilidade espermática e fertilidade.

Tabela 7. Média de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (HO) pré e pós congelamento, de sêmen bovino diluído em diferentes meios diluidores

| Tratamento       | HO positivo (%)            |                            |
|------------------|----------------------------|----------------------------|
|                  | Pré-congelamento           | Pós-congelamento           |
| <i>In natura</i> | 52,44 ± 18,30              | -                          |
| T1               | 55,72 ± 20,71 <sup>a</sup> | 30,33 ± 11,65 <sup>a</sup> |
| T2               | 59,22 ± 20,17 <sup>a</sup> | 30,84 ± 11,11 <sup>a</sup> |
| T3               | 59,39 ± 17,38 <sup>a</sup> | 30,78 ± 9,61 <sup>a</sup>  |
| T4               | 55,61 ± 17,33 <sup>a</sup> | 30,14 ± 11,04 <sup>a</sup> |
| T5               | 61,75 ± 16,85 <sup>a</sup> | 30,61 ± 11,64 <sup>a</sup> |
| Média            | 58,34 ± 18,29              | 30,54 ± 10,92              |

T1 = Tris (controle); T2 = Tris, com equex; T3 = Tris, com vitamina E + equex; T4 = Tris, com vitamina C; T5 = Tris, com vitamina E + equex e vitamina C.

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ), pelo Teste de Tuckey.

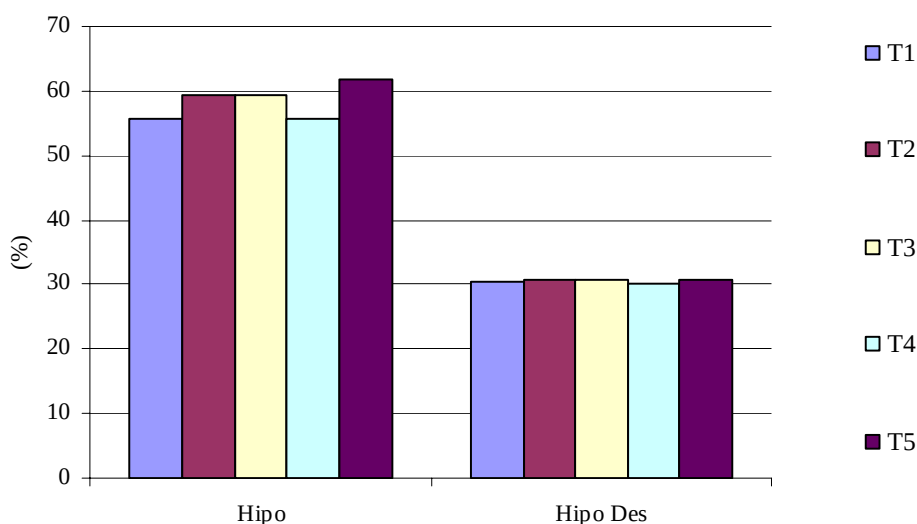


Fig.3. Valores médios de células espermáticas reagidas de sêmen bovino *in natura* e congelado/descongelado em diferentes meios de criopreservação, observados pelo teste hiposmótico.

#### 4.4. Teste de Fluorescência para Sêmen Congelado/Descongelado

Embora os resultados obtidos em diversos estudos sejam variados sobre a melhora da manutenção da motilidade espermática progressiva retilínea, os mesmos estudos mostraram que a utilização das vitaminas no diluente melhorou a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides (BECONI et al., 1993; AURICH e

SCHONHERR, 1997; O'FLAHERTY et al., 1997), indicando que esses antioxidantes inibem a peroxidação lipídica em condições hipotérmicas de estocagem, protegendo a membrana dos mesmos. Neste experimento também se observou efeito benéfico dos antioxidantes e do equex em relação ao controle (Tabela 8 e Fig. 4).

Tabela 8. Percentual médio de células espermáticas íntegras nos diferentes meios diluidores de criopreservação, observadas em sêmen congelado/descongelado de touros, pelo teste de fluorescência

|                      | Tratamentos             |                         |                          |                           |                           |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                      | T 1                     | T 2                     | T 3                      | T 4                       | T 5                       |
| Células íntegras (%) | 25,17±5,79 <sup>d</sup> | 29,67±9,98 <sup>c</sup> | 36,55±11,08 <sup>a</sup> | 31,83±10,03 <sup>bc</sup> | 35,78±10,41 <sup>ab</sup> |

T1 = Tris (controle); T2 = Tris, com equex; T3 = Tris, com vitamina E + equex; T4 = Tris, com vitamina C; T5 = Tris, com vitamina E + equex e vitamina C.

Médias com letras diferentes na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo Teste de Tuckey.

Observaram-se populações de espermatozóides íntegros (coram-se de verdes); semi-lesados, com membrana plasmática lesada e membrana acrossomal íntegra (coram o núcleo de vermelho e o acrossoma de verde); e espermatozóides lesados (coram-se de vermelho). Esta classificação do tipo celular está de acordo com ZÚCCARI (1998), OLIVEIRA (2003) e SANTOS (2003), porém neste experimento observou-se nova coloração, em que o acrossoma corava-se de verde bem fluorescente e a região pós acrossomal corava-se de verde pouco fluorescente ou não se corava, a cauda também se corava de verde. Essas células foram encaixadas na categoria de espermatozóides íntegros, pois se houvesse lesão na membrana, mínima que fosse, o iodeto de propídio atuaria colorindo de vermelho, o que não ocorreu. De acordo com HARRISON e VICKERS (1990) e AZÊREDO (1999), outras categorias podem estar presentes, tais como: células completamente vermelhas, inclusive a peça intermediária e células verdes (acúmulo de DIC) em todo o espermatozóide, exceto na região da peça intermediária corada em vermelho (IP), mas nenhuma que apresentasse tal coloração.

A porcentagem média de células intactas ( $31,8 \pm 4,66$ ) foi inferior a porcentagem média da motilidade espermática progressiva retilínea ( $56,93 \pm 0,74$ ), para todos os diluidores, sendo resultados semelhantes encontrados por VALCÁRCEL et al. (1994) em ovino, ZÚCCARI (1998) e SOUZA (2001) em equino. Novamente, a discrepância apresentada, mostra dificuldade em encontrar testes complementares fidedignos.



É importante salientar que apesar da leitura das lâminas ter sido possível, a técnica apresentou grande opacidade ao campo microscópio, dificultando a visualização dos espermatozóides. Como não foi objetivo deste estudo analisar a técnica, o protocolo preconizado por ZÚCCARI (1998) foi seguido. Entretanto, SOUZA (2001) testando a técnica de fluorescência verificou dificuldade de visualização dos espermatozóides de sêmen eqüino, utilizando citrato de sódio e meio TALP com diluidor a base de leite. Já OLIVEIRA (2003) e SANTOS (2003) não observaram dificuldade para visualizar os espermatozóides canino e eqüino, respectivamente, em diferentes meios de criopreservação.

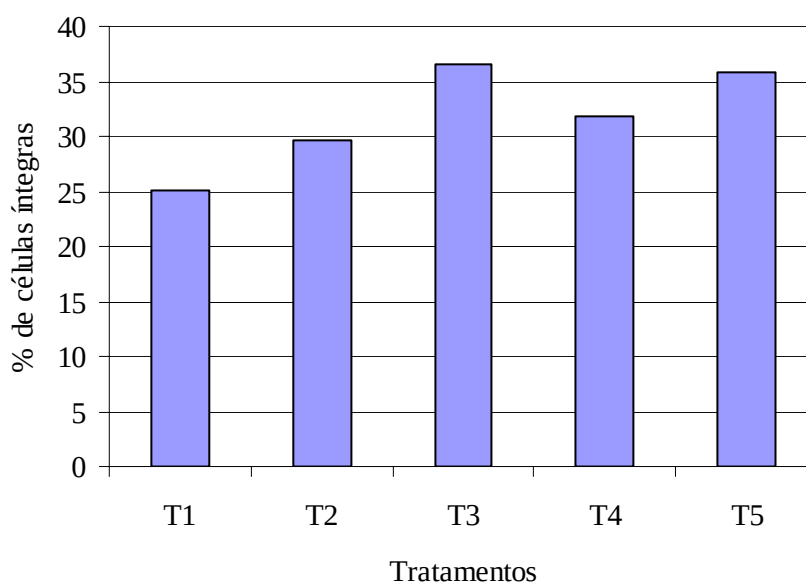


Figura 4. Percentual médio de espermatozóides com membranas íntegras em sêmen bovino congelado/descongelado em diferentes meios diluídores de criopreservação, observado pelo teste de fluorescência

Em valores absolutos, os resultados do teste hiposmótico e do teste de fluorescência mantiveram-se próximos para os diferentes tratamentos, aumentando a credibilidade dos resultados obtidos (embora não tenha ocorrido correlação significativa).

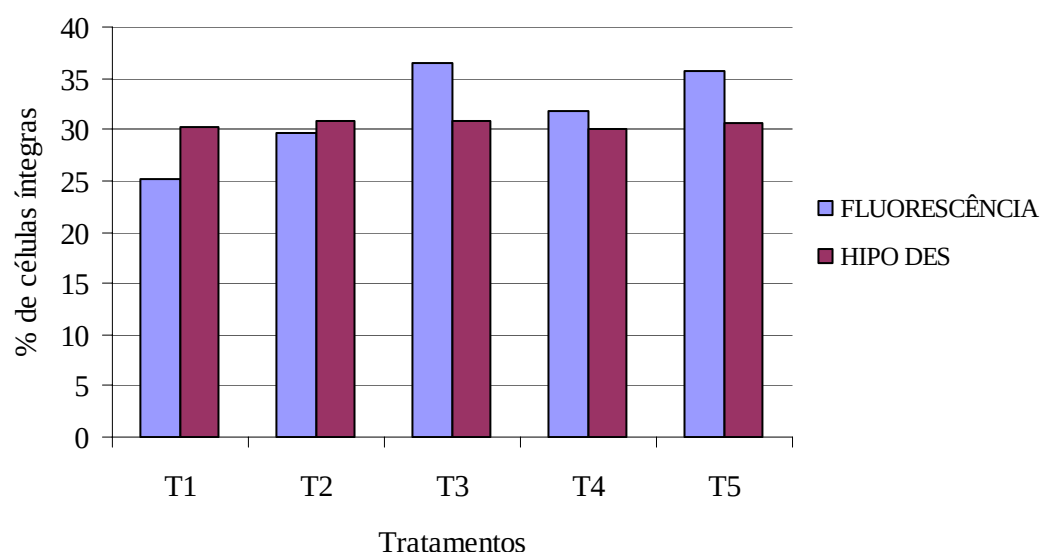


Figura 5. Valores médios obtidos nos testes hiposmótico e de fluorescência de sêmen bovino congelado/descongelado em diferentes meios diluidores de criopreservação

Os antioxidantes selecionados com base em suas propriedades físico-químicas, interagem com espécies de oxigênio reativo por diferentes caminhos. A vitamina E é incorporada à membrana dos espermatozóides enquanto a vitamina C atua no citosol e no meio extracelular.

O ácido ascórbico além de reduzir radicais oxigênio e neutralizar ROS protege a atividade da superóxido dismutase (BECONI et al., 1993) e regenera outros sistemas antioxidantes, como a vitamina E (BUETTNER, 1993; ARAÚJO, 2001), por isso esperava-se que os efeitos antioxidantes da vitamina E e C, separadamente, não apresentassem diferença significativa, enquanto que, o tratamento 5 diferisse de ambos os tratamentos pelo efeito sinérgico da vitamina C.

Porém, o que se observou neste estudo, foi que o tratamento 5 ( $35,78 \pm 10,41$ ) não diferiu ( $p > 0,05$ ) do tratamento 3 e 4 ( $36,55 \pm 11,08$ ;  $31,83 \pm 10,03$ , respectivamente) e que o tratamento 3 e 4 diferiram entre si ( $p < 0,05$ ), indicando que a utilização do tocoferol protege melhor as células espermáticas quando avaliadas pelo teste de fluorescência. Entretanto, quando se avalia o efeito destes antioxidantes pelos valores obtidos no teste hiposmótico (Fig. 5), verifica-se efeito nulo de ambos agentes quando comparados ao grupo controle. Isso pode ser explicado, por se tratar de compartimentos diferentes. Assim, pode-se ter lesão da cauda enquanto a membrana da

cabeça está perfeitamente viável, ou é possível que ocorra lesão na membrana da cabeça em alguma parte do processo de criopreservação, caracterizando espermatozóides reativos ao teste HO, mas incapazes de penetrar o ovócito (MELLO e HENRY, 1999).

O valor do tratamento 2 ( $29,67 \pm 9,98$ ) não diferiu do valor do tratamento 4, ou seja, a adição de equex teve mesmo efeito protetor que a adição da vitamina C. A adição do equex pode ter favorecido a integridade da membrana, por emulsificar a gema de ovo, fazendo com que as macromoléculas nela presente protegessem melhor as membranas espermáticas, estando de acordo com outros trabalhos (ARRIOLA e FOOTE, 1987; PEÑA et al., 2002), lembrando que a concentração não foi a mesma utilizada por estes autores. Adicionalmente o equex no tratamento 3 e 5 mostrou-se excelente emulsificador do tocoferol, aumentando a ação da vitamina E na membrana.

Todos os tratamentos (2, 3, 4 e 5) diferiram ( $p < 0,05$ ) do tratamento 1 (controle) ( $25,17 \pm 5,79$ ), indicando a ação protetora dos antioxidantes e do equex isoladamente (no tratamento 2) no processo de criopreservação do sêmen bovino.

O efeito sinérgico das vitaminas pode não ter sido significativo pelo fato da vitamina E ter sido melhor carregada e estar mais disponível à membrana pela utilização do equex como emulsificador da solução. Outra possibilidade foi o fato da vitamina E e C não ter tido tempo suficiente para interação, visto que logo após a homogeneização dos antioxidantes ao diluente o sêmen foi resfriado.

A atuação dos antioxidantes na qualidade do sêmen depende não somente das espécies, mas também dos parâmetros utilizados para avaliar a capacidade de fertilização. Embora a taxa de prenhes obtida com a inseminação seja o principal parâmetro para determinar a qualidade espermática, a taxa de motilidade espermática e integridade de membrana permitem boas estimativas da capacidade fertilizante (HARRISON e VICKERS, 1990).

## 5. CONCLUSÕES

De acordo com os valores obtidos neste experimento, pode-se concluir que:

- Não houve melhora da manutenção da motilidade progressiva retilínea dos espermatozóides com a utilização dos antioxidantes.
- O vigor espermático foi melhor com a utilização do tocoferol e do ácido ascórbico associados.
- O equex foi eficaz como emulsificador para o tocoferol para a manutenção da integridade da membrana.
- O uso de antioxidantes no diluente de sêmen para a criopreservação protege a membrana plasmática dos espermatozóides contra peroxidação lipídica, mantendo a integridade das mesmas.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGUERO, A.; MIRAGAYA, M.H.; MORA, N.G. et al. Effect of vitamin E addition on equine preservation. *Com. Biol.* V.13, p 343-356, 1995
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 477-506, 1997.
- AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.*, 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 Vet. Sci.* V.7: 3, p 145-173, 1987.
- ARAÚJO, J.M.A. *Química de Alimentos*. 2 Ed. Editora UFV, p 416, 2001.
- ARRIOLA, J.; FOOTE, R.H. glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *J. Dairy Sci.*, V. 70, p 1664-1670, 1987.
- ARRUDA, R.P.; BARNABÉ, V.H.; ALENCAR, M.M. et al. 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, 1997.,p. 178-179.
- ASBIA- *Manual de Inseminação Artificial* – p.51, Edição 2001.

- AURICH, J.E., SCHONHERR, U. et al. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriog.* V.48, p 185-192, 1997.
- AZERÊDO, G.A. Uso de sondas fluorescentes na avaliação da integridade de membrana plasmática de espermatozoides de caprinos (*Capra hircus* L.), submetidos à congelação na presença e ausência de plasma seminal. Universidade Estadual Paulista - UNESP. Jaboticabal, 1999. 72p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia).
- BAILEY, J.L., BUHR, M.M. Cryopreservation alters the  $Ca^{2+}$  flux of bovine spermatozoa. *Can. J. An. Sci.*, 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. *Theriog.*, V. 56, p 577-589, 2001.
- 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.; GRAVANCE, et al. The effect of reactive oxygen species on equine motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.*, V 21, p 895-902, 2000.
- BECONI, M.T., FRANCA, C.R., MORA, N.G. Effects of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriog.* V.40, p 841-851, 1993.
- BILODEAU, J.F., SUVRO-CHATTERJEE, SIRARD, M.A. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 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. *Dev. Biol.*, V. 95, p. 317-324, 1983.
- BLOMM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the Bull spermogram. *Nordisk Veterinarer medicin.* V.53, p 383-391, 1973.
- BOOTH, N.H., MCDOWELL, L.E. *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. Sexta edição, Editora Guanabara Koogan. S.A., Rio de Janeiro, 1992. 997pgs.

- BUENO, R. Criopreservação de sêmen canino, utilizando dois diluidores e dois protocolos de resfriamento. Departamento de medicina Veterinária - Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa – MG.2000. 91p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).
- BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Arch. Bioch. Biophys.* 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. *Gen. Pharmac.* V.28, p 169-175, 1997.
- CHANDONNET, L., ROBERTS, K.D., CHAPDELAIN, A et al. Identification of heparina – binding protein in bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.*, V. 26, p.313-318, 1990.
- CHERNOMORDIK, L., KOZLOV, M.M., ZIMMERBERG, J. Lipids in biological membrane fusion. *J. Membr. Biol.*, V. 146, p 1-14, 1995.
- 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 Reprod.* V.05, p 393-398, 1999.
- CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as assay to frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriog.*, 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. *Theriog.*, V.48, p 721-731, 1997.
- CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* V.59, p 7-11, 1998.
- CROSS, N.L., MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. *Biol. Reprod.*, V.41, p 635-641, 1989.
- DE LAMIRANDE, E., GANON, C. Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrossome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int. J. Androl.*, 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. *J. Androl.*, V12:2, p.112-118, 1991.
- DELLMANN, H.D, BROWN, E.M. *Histologia Veterinária*. Ed Guanabara Koogan.p 233-253, 1982.
- DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. *An. Med. Vet.*, V.4, p.215-224, 1967.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, n. 47 p. 243-255, 1993.
- 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. *Cryobiol.*, 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. *Theriog.*, V. 48, p. 853-863, 1997.
- FLESCH, F.M., GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim. Biophys.* 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. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 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, I, Uberaba, MG, Módulo V. Uberaba, p 128, 1999.
- FOURNIER-DELPECH, S., THIBAUT, C. Acquisition of sperm fertilizing ability. *Reprod. Mammalian and Man*. p 257-278, 1993.



- FÜRST, R. Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade. Departamento de Zootecnia - Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa-MG. 2002. 46p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Reprodução Animal).
- GO, K.J., WOLF, D.P. Albumin – mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol. Reprod.* V.32, p 145-153, 1985.
- GUYTON, A.C., HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 9.º edição, Editora Guanabara Koogan. S.A., Rio de Janeiro, 1997. 1014pgs.
- HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 6.º edição, Editora Manole LTDA, São Paulo, 1995. 582pgs.
- HALL, J.C., HADLEY, J., DOMAN, T. Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and membrane physical state during epididymal maturation. *J. Androl.*, V.12, p 76-87, 1991.
- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. *J. Roy. Microsc. Soc.*, V.76, p 84-97, 1957.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, V.88, p. 343-352, 1990.
- HENRY, M; NEVES, J.P. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. CBRA, 2ed., Belo Horizonte, 1998. 49p.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *An. Reprod. Sci.* V. 62, p 03-22, 2000.
- 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. *J. Reprod. Fert.*, V.70, p.219-228, 1984.
- JONES, R., MANN, T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* V.50, p255-260, 1977.
- KIM, K.S., FOSTER, J.A., GERTON, G.L. Differential release of guine pig sperm acrossosomal components during exocytosis. *Biol. Reprod.*, V. 64, p. 148-156, 2001.

- LANGLAIS, L., ROBERTS, K.D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gam. Res.* V. 12, p 183-224, 1985.
- LAPOINTE, S., SIRAND, M.A. Importance of calcium for the binding of oviductal fluid proteins to the membranes of bovine spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, V. 44, p. 234-240, 1996.
- LEFEBVRE, R., SUAREZ, S.S. Effect of capacitation of bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol. Reprod.* V.54, p 575-582, 1996.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. *Princípios de Bioquímica*. Ed Sarvier.p 838, 2000.
- MAGNAGO, L.G.P. Avaliação física e morfológica do sêmen de cães da raça pastor alemão resfriado a 5°C. UFMG – Escola de Veterinária. Belo Horizonte- MG. 2000. 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).
- MAHMOUD, A.I., PARRISH, J.J. Oviduct fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation: a flow cytometric study using lectins. *Mol. Reprod. Dev.*, V. 43, p. 554-560, 1996.
- MARTINS, L.F. Avaliação do sêmen e proteínas solúveis do plasma seminal de bodes da raça pardo alpina. Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa-MG. 2001. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).
- MAXWELL, W.M.C., WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. *An. Reprod. Sci.* V.42:1-4, p 55-65, 1996.
- MCDOWELL, L.R. *Vitamins in animal and human nutrition*. Iowa University Press, p.793, 2000.
- MELLO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. *Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.*, V. 51, n. 1. p 71-78, 1999.
- MIES FILHO, A; PUGA, J.M.P; GREGORY, R.M; et al. Proposição de normas ao exame andrológico de *Bos taurus*. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* V.6, p 21-24, 1982.

- MILLER, D.J., HUNTER, G. Effect of osmolarity and glycosaminoglycans on motility, capacitation, acrosome reaction, and in vitro fertilizability of bovine ejaculated sperm. *J. Dairy Sci*, V. 69, p. 2915-2924, 1986.
- MILLS, S.C., SCOTT, T.W. Metabolism of fatty acids by testicular and ejaculated ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, V. 18, p.367, 1969.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriog.*, V.57, p.1695-1706, 2002.
- NEILD, D. M., GADELLA, B. M. et al. Membrane changes during different stages of a freeze – thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriog.* V.876, p 01-13, 2002.
- NIKOLOPOULOU, M., SOUCEK, D.A., VARY, J.C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochim. Biophys.*, V. 815, p 486-498, 1985.
- OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reprod.* 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 acrosome reaction. *Theriog.* 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. *Androl.* V.29, p 269-275, 1997.
- OLIVEIRA, E.C.S. Viabilidade *in vitro* do sêmen de cão submetido a congelamento com diferentes diluidores e crioprotetores. Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Belo Horizonte MG. 2003. 63p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).
- PARKS, J. E., GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriog.* V.38, p 209-222, 1992.
- PARKS, J. E., LYNCHY, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiol.*, V. 29, p. 255-266, 1992.

- PARKS, J.E., HAMMERSTEDT, R.H. Developmental changes occurring in lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membranes. *Biol. Reprod.*, V. 32, p 653-668, 1985.
- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* V.38, p 1171-1180, 1988.
- PEÑA, A.I., LUGILDE, L.L. BARRIO, M. et al. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular  $Ca^{2+}$  concentration of dog spermatozoa. *Theriog.* V.8765, p 01-15, 2002.
- PEÑA A.I.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriog.*, V.54, p. 703-718, 2000.
- PICKETT, B.W., AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. *Equine Reprod.* 1.<sup>0</sup>ed.: Lea e Febiger, Philadelphia. 1993.p. 769-789,.
- QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.*, V. 60, p. 403-407, 1980.
- RANA, A.P., MAJUMDER, G.C., MISRA, S. et al. A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochim. Biophys.*, V.1061, p185-196, 1991.
- 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. *Theriog.* V.14, n.1, p. 1-12, 1980.
- REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. *An. Reprod. Sci.* V.36, p.77-86, 1994.
- ROBERTS, H., FOOTE, B.S. *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases.* 3 Ed. Theriog. p 898, 1986.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., LARSSON,B., PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage3 and techniques for sperm clean-up. *Reprod. Fert. Dev.* 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. *Theriog.* V.53, p. 1415-1420, 1999.
- S.A.E.G. (Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 1997 (Versão 7.0).
- SANTOS, G.C.J. Viabilidade de sêmen eqüino congelado em meios diluidores de diferentes composições. Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Belo Horizonte-MG. 2003. 58p. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).
- SCOTT, M.A. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *An. Reprod. Sci.*, V.60, p. 337-348, 2000.
- SCOTT, T.W. Lipid metabolism of spermatozoa. *J. Reprod. Fert. Suppl* 18, p 65-76, 1973.
- SEOUNGSOO, L., NOHYOUNG, P. Effects of selenium and vitamin E administration on semen characteristics in Hanwoo young bulls. *Korean J. Vet. Res.* V.40:2, p 403-414, 2000.
- 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. Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa – MG. Viçosa-MG. 2000. 75p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Reprodução Animal).
- SIKKA, S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front. Biosci.* V.1, p 78-86, 1996.
- SÖDERQUIST, L.; JANSSON, L.; LARSSON, K. et al. Sperm morphology and fertility in all bulls. *J. Vet. Med. A.*, 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. Campus Pirassununga - Universidade de São Paulo – USP. 2001. 76p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- STOLHAMAR, E.M.; JANSON, L.; PHILIPSSON, J. The impact of sperm motility on non-return rate in pre-selected dairy bulls. *Reprod. Nutr. Dev.*, V.34, p. 37-45, 1994.

- 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. *Biol. Reprod.* 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. *Biol. Reprod.*, V 52, p. 1372-1379, 1995.
- THOMAS, P.G.A.; SURMAN, V. MYERS-WALLEN, et al. Addition of sodium dodecyl sulphate to the Tris-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa. International Congress on Animal Reproduction, 12, The Hague; 1992, V. 4 p. 1823-1825.
- TRINCHERO, G. D., AFFRANCHINO, M. A., SHANG, L. M. et al. Antioxidant effect of bovine spermatozoa on lipid peroxidation. *Com. Biol.*, V.8:339, 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. *An. Reprod. Sci.* 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. *An. Reprod. Sci.* 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. *Theriog.* V.41, p 483-489, 1994.
- VANDENHEUVEL, F.A. Structure of membranes and role of lipids therein. In: *Advances in Lipid Research*. Eds. R. Paoletti and D. Kritchevsky. Academic Press, New York 1971.
- VASQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P. et al. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriog.*, 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. *Reprod. Fert. Dev.* V. 9, p 321-331, 1997.

- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *An. Reprod. Sci.* 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. *Reprod. Fert. Dev.*, 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. *J. Reprod. Fert.*, V.62, p. 483-492, 1981.
- WOLFE, C.A., JAMES, P.S., MACKIE, A.R. et al. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. *Biol. Reprod.*, V.59, p. 1506-1514, 1998.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E., NEILL, J. *The Physiology of Reproduction*.<sup>1.º</sup> 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. *Int J. Androl.* V.21, p 154-162, 1998.
- ZARINTASH, R.J., CROSS, N.L. The unesterified cholesterol content of human sperm regulates response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biol. Reprod.*, V. 55, p 19-24, 1996.
- ZÚCCARI, C.E.S.N. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. campus Botucatu – Universidade Estadual Paulista – UNESP. Botucatu – SP. 1998. 121p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária).

## ANEXO

Tabela 1A. Preparo da solução de fructose 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     |

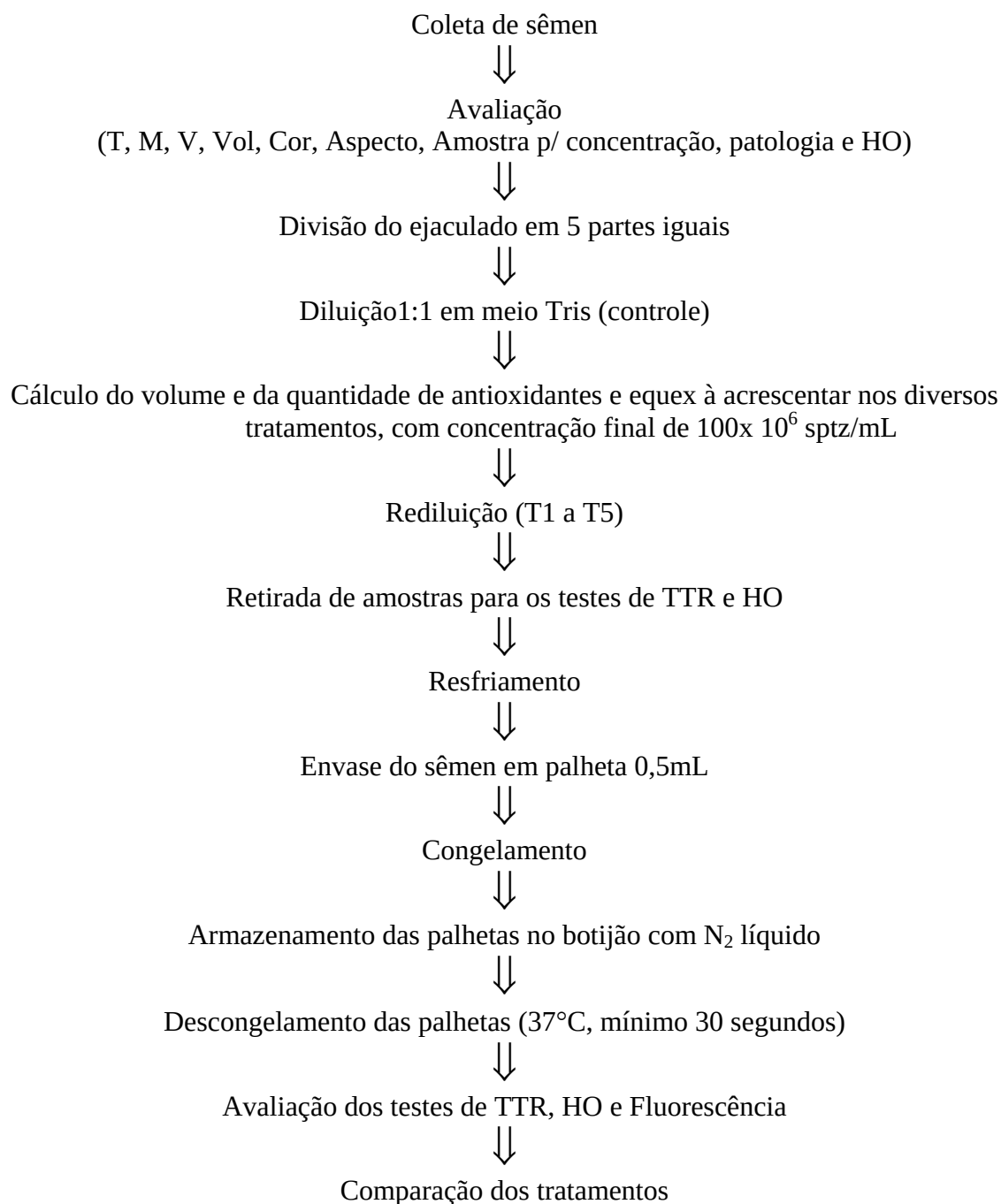
Fonte: Revell e Mrode, (1994)

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%<br>Solução fisiológica  | Diluição 1:80 |
| IV – Solução estoque de citrato de sódio a 3% | Citrato de sódio<br>Solução fisiológica | 3g<br>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)





Anexo 3: Fluxograma dos processos de congelamento, descongelamento e avaliação do sêmen bovino após descongelamento.