Eduardo Gualtieri de Andrade Perez

Efeito da adição de Glutationa na função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado

São Paulo
2009

Eduardo Gualtieri de Andrade Perez

Efeito da adição de Glutationa na função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof.Dr. Renato Campanarut Barnabe

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2214
FMVZ

Perez, Eduardo Gualtieri de Andrade
Efeito da adição de Glutationa na função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado / Eduardo Gualtieri de Andrade Perez. -- 2009.
60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe.

1. Radicais livres. Sêmen. Glutationa. Ovino. Criopreservação. I. Título.

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3	1	60 f	58 f
Resumo	1	3	xxx f.	58 f
Abstract	1	3	xxx f.	58 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito da adição de Glutationa na função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado", protocolado sob o nº1170/2007, utilizando 6 (seis) ovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe , está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

We certify that the Research "Effect of glutathione on ovine cryopreserved sperm function and oxidative status", protocol number 1170/2007, utilizing 6 (six) ovine, under the responsibility Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe , agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/2007.

São Paulo, 01 de outubro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - 05508-270 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 - fones: (11) 309107676/7671 - e-mail: fmvz@edu.usp.br

1934 | 2009 USP FMVZ 75

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Perez, Eduardo Gualtieri de Andrade

Título: Efeito da adição de Glutationa na função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ___/___/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

... à Deus por abrir meus caminhos e dar força para superar um tanto de coisas.

“"Se tiveres a fé do tamanho de uma semente de mostarda,
você pode mandar uma montanha mudar de lugar, e ela mudará."

...ao meus pai Sergio Eduardo de Andrade Perez

... à minha mãe Sonia Cristina Juliano Gualtieri

... ao meu avô Irineu Gualtieri

...à minha avó Célia Juliano Gualtieri

... à minha irmã Patrícia Gualtieri de Andrade Perez

.... à minha madrinha Sandra Regina Alves Menez por seu carinho e apoio.

...ao Professor Dr. Renato Campanarut Barnabe

...à Professora Dra. Valquiria Hyppolito Branabe

... ao meu amigo Marcílio Nichi

... ao meu professor Dr. Carlos Henrique Cabral Viana

...à todos os meus professores e amigos, que participaram ativamente da minha formação intelectual, moral e profissional
durante a pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Durante a pós-graduação vivenciei os piores e os melhores momentos de minha existência. Sem a ajuda, amparo e amizade de tantas pessoas, eu jamais encontraria forças para superar os obstáculos apresentados pela vida. Sou muito grato à Deus por ter colocado muito mais amigos que pedras ao longo de minha caminhada.

Não consigo encontrar palavras que ilustrem minha gratidão pelos queridos Professores Renato Campanarut Barnabe e Valquiria Hyppolito Barnabe que prontamente me receberam como orientado, apoiaram-me durante meus momentos de profunda tristeza e compartilharam horas de extrema alegria.

Meu amigo Marcílio Nichi...
... Sem a sua ajuda eu jamais conseguiria consolidar meus obejetivos. Como você mesmo disse, não se agradece pela amizade; então agradeço por estar ao meu lado e desejo que nossas parcerias perdurem.

Paola, um muito obrigado especial por toda sua presteza, carinho e dedicação!

Patrícia e Mariana, vocês tem um lugar especial em meu coração! Valeu!

Andressa, apesar de eu às vezes te irritar, eu gosto muito de você. Sua determinação e disciplina merecem destaque! Muito obrigado!

Agradeço aos meus pais Sergio e Sônia por sempre incentivarem e oferecerem condições para que eu estudasse, pelo amor, por simplesmente existirem. Amo vocês.

Agradeço ao meu avô Irineu que me ensinou a trabalhar, torceu por mim, vibrou à cada conquista, e ofereceu seu ombro à cada derrota.

Agradeço à minha avó Célia, que sempre cuidou de mim, me alfabetizou, ensinou a apreciar o estudo e literaturas e cuida de meus animais em minha ausência. Valeu vó!

Meus queridos e saudosos avós Oswaldo e Jove que, infelizmente já não vivem mais, obrigado por todo amor e ensinamentos. Tenho certeza que estão felizes por mim e me abençoam.

Lemão, Leninha e Nando, sem vocês, eu jamais poderia ter largado a Fazenda para vir estudar em Poços de Caldas. Obrigado pelo carinho, fidelidade e por serem meus olhos enquanto estou fora.

Agradeço aos meus queridos amigos Paquê(Paulo Henrique) e Urso(Bernardo), pelo apoio, amizade, conselhos e por fazerem parte família República 55.

Agradeço à professora Maria Adriana pelos ensinamentos, carinho e confiança.

Felipe (Tá largado), valeu mano! “É nóis na fita!”.

Professora Mayra Elena Ortiz D´Avila Assumpção, muito obrigado pelos ensinamentos e críticas construtivas.

Professor Pietro Sampaio Baruselli muito obrigado pela oportunidade de ministrar aulas em sua disciplina!

Professora Eneiva Carla Celeghini, muito obrigado pela indicação para o mestrado e seus ensinamentos.

Professora Camila Infantosi Vannucchi , valeu!

Marcela Pecora Milazotto muito obrigado pelo reboque!

Renata Simões, sem o SCSA, minha tese jamais seria a mesma! Obrigado!

Dr. Ricardo Pimenta Bertolla, muito obrigado pelos ensinamentos e pela prontidão em participar de minha banca.

Cabral, como sempre, obrigado pelo seu incondicional apoio e amizade!

A todos os funcionários do VRA: Harumi, Thais, Alice, Dona Silvia, Jocimar, Miquel, Maria Amélia, Irailton, Belau e Luiz um abraço muito apertado e muito obrigado por tudo!

Paulo Varoni, valeu amigão!

Romero, Pião, João Rafel, Rodrigo das Cabras, Diego BS, Glauquito, Marcão, Drups (Sal). Valeu!!!! Abração galera!!!

Agradeço à funcionária Elza por sua presteza e simpatia!

Agradeço à minha casa, a Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, por toda condição de angariar meus objetivos.

Agradeço ao Cnpq pela bolsa de estudos concedida.
Agradeço à FMVZ pela oportunidade de fazer pós-graduação na maior e melhor universidade do Brasil.

À aqueles que acabei por esquecer, peço desculpas e desejo que sintam –se especialmente abraçados por mim. Eu realmente escrevi os agradecimentos na última hora.

EPÍGRAFE

There's a hero, if you look inside your heart.
You don't have to be afraid of what you are.
There's an answer, if you reach into your soul,
And the sorrow that you know will melt away.

And then a hero comes along, with the strength to carry on,
And you cast your fears aside, because you know you can survive.
So when you feel like hope is gone,
Look inside you and be strong,
And you'll finally see the truth, that a hero lies in you.

It's a long road, when you face the world alone.
No one reaches out a hand for you to hold.
You can find love, if you search within yourself,
And the emptiness that you felt will disappear.

And then a hero comes along, with the strength to carry on,
And you cast your fears aside, because you know you can survive.
So when you feel like hope is gone,
Look inside you and be strong,
And you'll finally see the truth, that a hero lies in you.

Lord knows, dreams are hard to follow.
But don't let anybody, tear them away.
Hold on, there will be tomorrow.
In time, you'll find the way.

And then a hero comes along, with the strength to carry on,
And you cast your fears aside, because you know you can survive.
So when you feel like hope is gone,
Look inside you and be strong,
And you'll finally see the truth, that a hero lies in you .

That a hero lies in…
Every single one of you

(MARIAH CAREY, 1993)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Formação das espécies reativas de oxigênio (NICHI, 2003)..... 28

Figura 2 Reação de Fenton, adaptado de Barros (2007)..... 30

PEREZ, E. G. A. **Efeito da adição de Glutationa na função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado.** [Effect of glutathione on ovine cryopreserved sperm function and oxidative status] 2009. XXX f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os ácidos graxos poliinsaturados garantem a fluidez à membrana plasmática do espermatozóide. No entanto, as duplas ligações presentes, os tornam mais susceptíveis aos efeitos nocivos da peroxidação lipídica que produz grande quantidade de radicais livres. A adição do antioxidante Glutationa reduzida (GSH) poderia conferir proteção aos espermatozóides de ovinos submetidos a criopreservação contra danos, em membranas plasmáticas, acrossomais, DNA e atividade mitocondrial causados pelo estresse oxidativo. O objetivo do presente experimento foi: avaliar se a GSH protege os espermatozóides ovinos criopreservados contra danos causados pelo estresse oxidativo. Foram colhidos ejaculados de quatro carneiros adultos. As amostras foram avaliadas após a criopreservação (T1). As análises convencionais foram: concentração, motilidade, vigor e morfologia. As análises funcionais foram: integridade de membrana, integridade acrossomal, integridade de cromatina e atividade mitocondrial. O sêmen foi criopreservado utilizando o diluidor Tris-gema-critrato suplementado com GSH (controle, 1, 5 e 10mM). Uma alíquota de cada amostra foi submetida ao protocolo de peroxidação lipídica induzida e subseqüente quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico(TBARS). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Sistema SAS para Windows. Os resultados indicam que não houve efeito do tratamento com GSH sobre as variáveis avaliadas pelos testes convencionais. A GSH diminuiu a proporção de acrossomas íntegros. Amostras tratadas com 5mM de GSH apresentaram menor percentual de células com membranas íntegras quando comparadas com as amostras controle e aquelas tratadas com 10 mM; , o percentual de células sem atividade mitocondrial foi influenciado pela GSH também não houve de efeito nas TBARS. As amostras do grupo controle foram mais susceptíveis à desnaturação da cromatina. Em conclusão, a adição do antioxidante Glutationa reduzida (GSH) confere proteção ao DNA e à atividade mitocondrial de espermatozóides de ovinos.

Palavras-chave: Radicais livres. Sêmen. Glutationa. Ovino. Criopreservação

PEREZ, E. G. A. **Effect of glutathione on ovine cryopreserved sperm function and oxidative status** [Efeito da adição de Glutationa na função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado.] 2009. XXX f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

It is well known that sperm is extremely susceptible to the oxidative stress. This occurs especially due to the high content of poly-unsaturated fatty acids (PUFAs) in its plasma membrane. The PUFAs provide the necessary fluidity to the plasma membrane, which allows the sperm to move. However the double bonds present in those fatty acids are more susceptible to the oxidative stress. Therefore, sperm is highly dependent of the extra-cellular environment antioxidant protection. Studies in human indicate that cryopreservation may lead to damages to the sperm due to the oxidative stress. The objective of this experiment was to study if the antioxidant glutathione (GSH) may protect ovine cryopreserved sperm against the damages caused by the oxidative stress.

Semen samples of four rams were collected using an artificial vagina. Samples were then cryopreserved using Tris-egg yolk extender supplemented with different concentrations of reduced glutathione (control, 1, 5 and 10 mM). After thawing, samples were evaluated using conventional (motility and vigor) and functional tests (membrane integrity and mitochondrial activity). An aliquot of each thawed sample was submitted to the protocol of induced lipid peroxidation using ascorbate (20 mM) and ferrous sulphate (4 mM), with the further measurement of the tiobarbituric acid reactive substances (TBARS), as an index of oxidative stress. This technique aims to evaluate sperm oxidative status by its susceptibility to the lipid peroxidation. Statistical analysis was performed using SAS system for Windows. The results indicate that there was no effect of GSH on the variables assessed by conventional tests. GSH decreased the proportion of intact acrosomes. Samples treated with 5 mM GSH showed a lower percentage of cells with intact membranes when compared with control samples and those treated with 10 mM, the percentage of cells with mitochondrial activity was affected by GSH and there was also no effect on TBARS. Samples from the control group were more susceptible to denaturation of chromatin. In conclusion, the addition of the antioxidant Glutathione (GSH) offers protection to DNA and mitochondrial activity of ovine sperm.

Key words: Free radicals. Semen. Glutathione. Ovine. Cryopreservation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GSH (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen ovino criopreservado sobre a motilidade, vigor, defeitos maiores, menores e totais - São Paulo2009 46

Tabela 2 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GSH (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen ovino criopreservado sobre a integridade de membrana (Vitalidade), integridade de acrossomo (ACRO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV) e fragmentação de DNA (SCSA) - São Paulo - 2009 48

Tabela 3 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GSH (1mM, 5mM e 10mM) sobre a produção total de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, ng/mL) e sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, ng/10^6 sptz) em sêmen ovino criopreservado submetido ao desafio oxidativo pelo ascorbato e o sulfato de ferro - São Paulo - 2009 49

Tabela 4 - Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; ng/mL e ng*10^6), fragmentação do DNA (SCSA), espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), espermatozóides com membrana plasmática íntegra (Vivos), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), defeitos espermáticos maiores (DEFMA) e menores (DEFME), Motilidade (MOT) e Vigor (VIG) de amostras espermáticas de cães, coletadas através de manipulação digital e criopreservadas com diferentes concentrações de GSH (0; 1, 5 e 10mM) – São Paulo – 2009 51

LISTA DE SÍMBOLOS

DNA	ácido desoxirribonucléico
AGPIs	ácidos graxos poli-insaturados
NAHDP	adenosina difosfato de sódio
α	Alfa
O_2^-	ânion superóxido
B	Beta
CCO	citocromo c- oxidase
POPE	coloração simples
Cu++	Cobre
DAB	3,3 diaminobenzidina
ROS	espécies reativas de oxigênio
Sptz	Espermatozóide
E/N	eosina – nigrosina
Fe^{++}	Ferro
GSH	Glutationa
GSSG	glutationa oxidada
Gpx	glutationa peroxidase
GRD	glutationa redutase
G	Gramas
°	Graus
°C	graus Celsius
LSD	least statistical difference
MDA	Malondialdeído

®	marca registrada
<	menor que
CH_2^-	Metileno
µM	Micromolar
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
H_2O	molécula de água
MOT	Motilidade
Ng	Nanograma
P	nível de significância
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
%	Porcentagem
Ph	potencial hidrogênio iônico
Qsp	quantidade suficiente para
Kg	Quilograma
OH^-	radicais hidroxila
PBS	solução tampão de fosfato
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
SOD	superóxido dismutase
TBA	teste do ácido 2-tiobarbitúrico
UI	unidade internacional
VIG	vigor espermático

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

2 REVISÃO DE LITERATURA 24

2.1 Colheita de sêmen ovino 24

2.2 Aspectos gerais do sêmen ovino 24

2.3 Aspectos gerais da conservação do sêmen 25

2.4 Criopreservação 26

2.5 Estresse oxidativo (EO) 27

2.6 Mensuração do estresse oxidativo 28

2.7 Glutationa reduzida 29

3 HIPÓTESE 33

4 OBJETIVO 35

5 MATERIAL E MÉTODO 37

5.1 Animais 37

5.2 Colheita do sêmen 37

5.3 Processamento do sêmen 38

5.4 Avaliações convencionais 39

5.5 Avaliação da motilidade espermática 39

5.6 Avaliação do vigor espermático 39

5.7 Avaliação da morfologia espermática 39

5.8 Testes funcionais 40

5.9 Avaliação da resistência ao estresse oxidativo 40

5.10 Avaliação da integridade da membrana plasmática 40

5.11 Avaliação da atividade mitocondrial 41

5.12 **Ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA)**..... 42

5.13 **Avaliação da resistência ao estresse oxidativo**..... 42

5.14 **Análise estatística**..... 43

6 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**..... 46

7 **CONCLUSÃO**..... 53

REFERÊNCIAS..... 55

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a ovinocultura nacional tem demonstrado grande potencial para o agronegócio, sendo uma boa opção de produção de carne, principalmente para médios e grandes produtores. Esta atividade caracteriza-se por seus rebanhos serem de diferentes tamanhos e produtividades, com leve tendência para médios e grandes produtores.

A inclusão de novas áreas produtoras não tradicionais, principalmente nas regiões Sudeste e Centro-oeste, levou a um aumento da produção nos últimos anos, mas que ainda não é suficiente para suprir a demanda do mercado interno.

Estes fatores justificam o grande interesse de se intensificar a exploração econômica dos ovinos, uma vez que a ovinocultura já é a principal atividade produtiva de diversas propriedades (SALAMON et al., 2000).

As inadequadas técnicas aplicadas à reprodução nos rebanhos podem comprometer a lucratividade da exploração por impedir que o potencial produtivo máximo do rebanho seja atingido.

Biotecnologias como a inseminação artificial, transferência de embriões, fecundação *in vitro* (FIV) e clonagem, são empregadas, cada vez mais frequentemente, na ovinocultura nacional, visando a excelência dos rebanhos.

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica de grande importância, desenvolvida para o manejo reprodutivo e melhoramento genético dos animais, visto que, é ferramenta de controle de enfermidades reprodutivas, possibilita a dispersão de material genético, favorece testes de progênie, implanta programas de controle zootécnico e melhor utiliza reprodutores de relevância produtiva (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

A necessidade de produzir grande número de borregos com sêmen de carneiros oriundos de criatórios distantes estimulou o desenvolvimento de técnicas de transporte e estocagem de sêmen (SALAMON et al., 2000).

A criopreservação de espermatozóides é uma biotecnologia de extrema importância para programas de inseminação artificial, pois viabiliza a utilização de reprodutores de localidades distantes, mesmo depois de mortos, uma vez que o sêmen estocado à -196ºC (temperatura do nitrogênio líquido) permanece viável por tempo indefinido (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

Entretanto, sucesso da criopreservação depende muito da susceptibilidade específica do espermatozóide a baixas temperaturas (HOLT, 2000), resultados obtidos na criopreservação de sêmen de diversas espécies são muito diferentes entre si, devido às particularidades dos espermatozóides de cada espécie, principalmente no que se refere à composição e estrutura de membranas biológicas (DARIN-BENNETT; WHITE, 1977).

Ollero et al. (1998), relatam como principais danos causados pelo decréscimo da temperatura, alterações em membranas acrossomais, plasmática e em mitocôndrias, o que pode acarretar a liberação desordenada e exacerbada das espécies reativas de oxigênio (ROS).

A membrana plasmática dos espermatozóides ovinos tem uma composição particular que dificulta sua criopreservação com eficiência. Por essa razão, a utilização de sêmen congelado em programas de inseminação artificial, com deposição cervical, necessita de diluidores que melhorem as taxas de concepção por serviço (VALLERIOTE et al., 2005).

Assim sendo, a criopreservação de sêmen ovino é uma área de pesquisas cujo interesse é crescente sendo tema de diversos estudos atuais a qual envolve uma interrupção artificial do processo fisiológico de capacitação espermática pós-ejaculação.

O sêmen descongelado sofre uma capacitação prematura, em parte, relacionada à ligação de ROS e peroxidação lipídica. Um excesso de ROS também leva ao decréscimo da motilidade e fertilidade além de serem, também, deletérias ao DNA e membranas (AISEN et al. 2005).

A integridade das membranas e do DNA requer uma concentração adequada de Glutationa (GSH). Assim, a adição de antioxidantes aos meios para criopreservação vem sendo adotada com o intuito de se driblar o estresse oxidativo e garantir melhor qualidade espermática após a descongelação (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, a ovinocultura está em expansão conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística(IBGE, 2004), sendo hoje, o oitavo maior criador de carneiros do mundo.

2.1 Colheita de sêmen ovino

Em ovinos são utilizadas duas metodologias para colheitas de ejaculados; vagina artificial e eletroejaculação. O método de vagina artificial é o de eleição, uma vez que a eletroejaculação tem o inconveniente de produzir uma amostra que pode não ser fidedigna ao ejaculado natural do reprodutor. Esta particularidade sempre deve ser ponderada quando da interpretação de um exame andrológico (CBRA, 1998).

A colheita de sêmen em ovinos deve ser preferencialmente, realizada pelo método de vagina artificial, em virtude desta metodologia se aproximar das condições de monta natural, influenciando positivamente a libido do macho e os parâmetros espermáticos do ejaculado (CBRA, 1998; JIMENÈZ, 2004; VALLERIOTE, 2005).

2.2 Aspectos gerais do sêmen ovino

Ollero et al. (1998), relatam que a membrana é composta de três classes lipídicas principais: glicolípideos, fosfolipídeos e colesterol. A fluidez da membrana depende da temperatura, teor de colesterol e seu grau de saturação; colesteróis saturados garantem rigidez enquanto os insaturados conferem maior fluidez às membranas.

Watson (1981) relata que os fosfolipídeos representam até 70% do total de lipídeos da membrana espermática; em carneiros, 45% são plasmalogênios e o espermatozóide ovino é distinto das demais espécies pela sua alta proporção de fosfoglicerídeos de colina.

Nos espermatozóides ovinos, 60% das ligações fosfolipídicas dos ácidos graxos são no carbono 22 sendo que em espécies mais resistentes ao choque-frio, a proporção é de 30% das ligações. Além disso, os espermatozóides de carneiros contêm proporções menores de ácidos palmítico, esteárico e oléico (WATSON, 1995).

A proporção entre colesteróis poliinsaturados e saturados é de 2.5 vezes ou mais se comparada à taxa de espécies resistentes ao choque-frio como os coelhos e humanos (DARIN-BENNETT, WHITE, 1977).

2.3 Aspectos gerais da conservação do sêmen

A susceptibilidade ao choque frio se desenvolve quando o espermatozóide atravessa o epidídimo, mas espermatozóides da cauda epididimária são menos susceptíveis ao choque frio que os pós-ejaculados (WATSON, 1995).

Durante a primeira etapa da congelação, que é o resfriamento, ocorre a mudança de fase dos colesteróis de membrana, que passam da fase líquida para a fase gel, etapa que pode danificar estruturas espermáticas (p. ex canais de membrana) devido ao fenômeno denominado choque-frio o qual pode provocar um rearranjo nas ultra-estruturas celulares, determinando alterações em mecanismos fisiológicos, como por exemplo, na permeabilidade das membranas (OLLERO et al., 1998). Watson (1981) relata que os principais danos causados pelo choque-frio, são: alterações no metabolismo de carboidratos, liberação de enzimas intracelulares, liberação de lipídeos e alterações na distribuição de cátions.

A susceptibilidade ao choque frio se desenvolve quando o espermatozóide atravessa o epidídimo, mas espermatozóides da cauda do epidídimo são menos susceptíveis ao choque frio que os pós-ejaculados (WATSON, 1995).

Após o choque-frio, a glicólise anaeróbica e a atividade respiratória diminuem no espermatozóide ovino. A frutólise também é reduzida quase à zero em espermatozóides com motilidade antes do choque-frio. Proteínas intracelulares como o citocromo C, são liberadas do espermatozóide que sofreu o choque, porém, isto é considerado um efeito não imediato. Estes achados comprovam a injúria mitocondrial, que é observada em peças intermediárias de espermatozóides submetidos à eletromicrografia (WATSON, 1981).

A liberação de enzimas intracelulares tem sido demonstrada como um resultado do choque-frio. Estas enzimas incluem lactato-desidrogenase, transaminases, fosfatase alcalina e ácida, glicose-6-fosfatodesidrogenase e glicose fosfato isomerase (WATSON, 1981).

Segundo Watson (1981), os lipídeos são perdidos pelos espermatozóides de ovinos como um resultado do choque-frio. Estes são predominantemente fosfolipídeos, e a natureza particulada deste material liberado do espermatozóide de carneiro, sugere que há fragmentação da membrana. Fosfoglicerídeos de colina são freqüentemente liberados dos espermatozóides ovinos.

2.4 Criopreservação

A criopreservação é uma biotécnica que consiste na anabiose e estocagem de material vivo por tempo indeterminado sob baixas temperaturas. No entanto, segundo Holt (2000), a membrana, de espermatozóides submetidos à baixas temperaturas, sofre modificações na estrutura lipídica e permeabilidade o que parece reduzir a viabilidade e funções fisiológicas espermáticas.Por outro lado, a diluição em meios para crioproteção, aparentemente garante resistência ao choque-frio para os espermatozóides.

Um dos grandes entraves para a criopreservação consiste na presença de água nas células vivas. Uma vez que esta se solidifica a 0°C, formam-se cristais de gelo que desintegram a estrutura celular. A presença de solutos livres no meio atraem osmoticamente moléculas de água, comprometendo assim a integridade de biomoléculas e contribuindo para o processo de desidratação celular (MAZUR, RIGOPOULUS, 1983).

Além disso, segundo. Holt (2000) é importante se estimar o fluxo hidráulico nas membranas celulares por meio de cálculos, porém isso se torna difícil considerando que uma estrutura danificada pelo resfriamento já teve a integridade da membrana comprometida, acarretando em alterações importantes na condutibilidade hidráulica.

Em curvas de resfriamento lentas (-0,25 a -0,40 ºC/min), a desidratação celular é mais acentuada, fato que favorece a integridade dos espermatozóides, uma vez que a quantidade de gelo intracelular fica menor (WATSON, 1995). Os cristais de gelo formados no meio extracelular também devem sofrer reaquecimento lento, para que a água seja liberada lentamente, favorecendo a rehidratação das células. Se ocorrer um reaquecimento rápido,

poderia ancontecer um influxo brusco de água o qual promoveria edema celular e conseqüentemente dano à membrana plasmática (WATSON, 1995).

Em curvas de resfriamento muito rápidas (>-0,60 ºC/min), não há tempo para a água se difundir para o meio extracelular (MAZUR, 1980). Assim, quando o sêmen é congelado rapidamente, a descongelação deve ser rápida, visto que as células não foram completamente desidratadas, logo, não haverá influxo brusco de água. Entretanto, deve-se observar que o aquecimento demasiadamente rápido, resulta em alterações da membrana acrossomal, organelas e metabolismo similares às alterações provocadas pelo choque-frio. Este processo é denominado estresse de reaquecimento e o dano às células se dá em função da recristalização dos microcristais em aglomerados, formando grandes cristais que, danificam a célula (HOLT & NORTH, 1994).

No processo de congelação, a faixa de temperatura considerada crítica para danos no espermatozóide, fica entre –15 e -50ºC. Quando o sêmen atravessa esta faixa crítica, a atividade metabólica cessa e as células permanecem inativas (HOLT, 2000).

Watson (1995) resume o exposto acima, mencionando que, o dano à membrana provocado pela congelação se deve ao atrito gerado pela água passando rapidamente pela membrana, excedendo a sua capacidade de conduzi-la. Dessa forma, a perda da integridade da membrana resulta no crescimento do gelo extracelular para dentro da célula. Neste caso, o gelo intracelular é conseqüência, não a causa do dano à membrana.

2.5 Estresse oxidativo (EO)

É impossível abordar o estresse oxidativo (EO), sem entender primeiramente, o que é um radical livre; qualquer molécula, ou átomo com um ou mais elétrons despareados (ou seja, com muita afinidade de ligação), é considerada um radical livre. O EO é o resultado de um desequilíbrio entre a concentração de antioxidantes (agentes redutores) e concentração radicais livres (agentes oxidantes); este desequilíbrio, muitas vezes, ocorre em virtude de exacerbação da produção de ROS (NICHI, 2003).

Entre as espécies reativas de oxigênio, as mais importantes são o radical hidroxila (OH^-), o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o óxido nítrico (NO_2) (AGARWAL; IKEMOTO; LOUGHLIN, 1994). Dentre estas, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são as ROS formadas primariamente, sendo o H_2O_2 gerado através da

dismutase (enzimática ou não enzimática) do ânion superóxido (NICHI, 2003). A ROS mais reativa e prejudicial é o radical hidroxila (OH^-), que pode ser formado através do H_2O_2 e do ânion superóxido, e através da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico, produzindo o peroxinitrito ($OONO^-$), que então irá se decompor para NO_2 e OH^- (Figura 1) (BARROS, 2008).

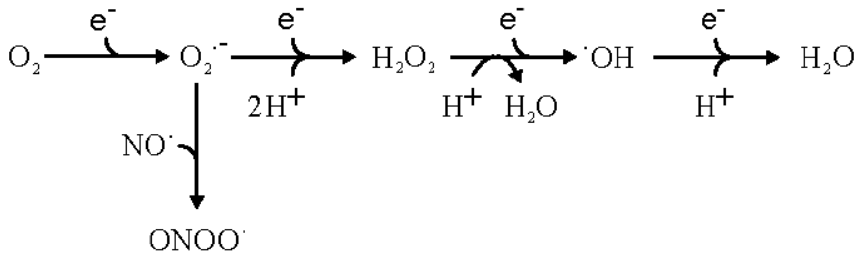

Figura 1: Formação das espécies reativas de oxigênio (NICHI, 2003).

Embora, quando as ROS apresentam-se mais abundantes que os antioxidantes em um dado sistema acarretarem o EO, é importante frisar que estas moléculas instáveis, quando em concentração e momento adequado, participam também de processos fisiológicos tais como: hiperativação, capacitação e ligação do espermatozóide à zona pelúcida (NICHI, 2003).

Os colesteróis poliinsaturados são moléculas que apresentam mais de uma ligação entre os átomos de hidrogênio e carbono. Do ponto de vista eletroquímico, ligações múltiplas possuem menor força de ligação individual, portanto estão mais sujeitas à perdas de átomos (e elétrons), fato este que as confere maior instabilidade. Então, ácidos graxos insaturados, estão mais sujeitos à ação das ROS as quais promovem a peroxidação lipídica.

A alteração dos lipídios presentes nas membranas pode alterar a sua fluidez e a permeabilidade seletiva. Com tais funções comprometidas, as células podem sofrer degeneração e necrose, liberando ainda maior quantidade de ROS para o sistema no qual elas estão dispostas. Este é um fenômeno que ocorre em forma cascata; um pequeno evento desencadeia uma série de outros, de proporção crescente, que determina danos com maior extensão e, consequemente de mais difícil reparação. Esta cascata pode determinar o EO.

2.6 Mensuração do estresse oxidativo

Para a dosagem de ROS no sêmen são necessárias técnicas muito sensíveis, visto que a produção destes pelo sêmen é relativamente baixa quando comparada com a produzida por leucócitos, por exemplo, e, além disso, a meia-vida das ROS é muito curta (BARROS, 2007). Para mensurá-las são usadas técnicas de quimioluminescência, que, mesmo sendo bastante sensíveis, não conseguem dosar níveis de ROS que ocorrem em amostras seminais de homens normais (NICHI, 2003).

A dosagem de componentes oxidados que se mantém nos fluidos corporais é uma técnica mais específica, visto que avalia indiretamente o estresse oxidativo efetivamente ocorrido, e, um destes componentes, o malondialdeído (MDA), pode ser usado como um índice de peroxidação lipídica (BARROS, 2007). A avaliação da concentração de MDA tem sido extensivamente utilizada como marcador da peroxidação lipídica (NICHI, 2003).

Entre os diferentes métodos analíticos estabelecidos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado, sendo que nesta reação, o composto formado pela reação entre o MDA e o TBA pode ser mensurado através de sua absorbância ou fluorescência (NICHI, 2003).

Uma ferramenta importante e muito utilizada para a avaliação dos níveis de proteção antioxidante e de peroxidação lipídica é a geração artificial de ROS, o que permite avaliar dois aspectos: a peroxidação lipídica espermática e a disponibilidade de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática do espermatozóide, pelos quais iria se iniciar a reação peroxidativa em cadeia; e a habilidade do espermatozóide em inibir a propagação deste processo através de mecanismos antioxidantes (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993a).

Uma técnica frequentemente utilizada para provocar a peroxidação lipídica, é a indução pelo sistema sulfato ferroso ($FeSO_4$) + ácido ascórbico (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993b; GRIVEAU et al., 1995). Esta técnica se baseia na formação de metais de transição (Ferro e Cobre) que irão catalisar a quebra de hidroperóxidos pré-existentes iniciando a propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica promovida pelo ferro através da reação de Fenton (Figura 2). O ácido ascórbico, por sua vez, provocaria a redução do Fe^{3+} para Fe^{2+}, alimentando novamente a reação (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993b)

$$Cu^{+}/Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{2+}/Fe^{3+} + OH^{-} + HO\bullet$$

Figura 2: Reação de Fenton, adaptado de Barros (2007)

2.7 Glutationa reduzida (GSH)

A GSH está presente em todo organismo animal; não apenas em células somáticas mas em gametas também. Ela é um thiol tripeptídeo(γ-glutamilcistenilglicina) o qual é o maior composto de sulfidrila não protéico que desempenha diversas funções biológicas, dentre elas a reação de redução que se contrapõe a processos oxidativos. Esta molécula pode ser rapidamente utilizada como uma defesa contra o EO. A proteção contra o dano oxidativo conferida pela GSH se deve ao seu grupamento sulfidrila (SH); pode estar em duas formas: a reduzida e a oxidada (GSSG). O ataque da GSH as ROS é facilitado pelas interações com enzimas associadas tais como a glutationa redutase e a glutationa peroxidase (GPx)(LUBERDA, 2005).

A GPx é uma enzima antioxidante selênio dependente, que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (e também produtos da peroxidação lipídica) na presença da GSH, a qual é convertida em GSSG. Em seguida, esta forma sofre reação de redução pela glutationa redutase na presença de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenosina (NADPH) - o qual é doador de elétrons nas reações da via das pentoses-fosfato, havendo redução de $NADPH^{+}$ é convertido a NADP (ARUOMA et al., 1989).

A proteção antioxidante no sêmen de mamíferos é dependente de um complexo sistema composto por agentes enzimáticos e não enzimáticos; segundo AITKEN (1999), o principal antioxidante não enzimático é a GSH e sua função está relacionada à suas interações com outros sistemas (p.ex. a superóxido dismutase) como mecanismo profilático às ROS.

BILODEU (2000) relata que espermatozóides bovinos submetidos à incubação em ambiente aeróbio, apresentam depleção da concentração intracelular sem a ocorrência de aumento da concentração de GSSG; isto pode ser elucidado pelo fato da GSH interagir com outras moléculas e se apresentar indisponível (GSH oculta). Pelo fato de proteínas estarem ligadas à GSH, na forma de dissulfitos, estas seriam protegidas contra a injúria oxidativa. Por outro lado, os compostos acima mencionados, também podem ter relação com um mecanismo de estocagem intracelular.

No entanto, a presença de GSH, em meios utilizados na inseminação artificial, tem sido relacionada com o aumento na taxa de blastocistos, mas não afeta o número de células do trofoblasto. Além disso, já foi demonstrado que as concentrações de GSH intracelular em oócitos não sofrem influência da presença da mesma no meio extracelular. Isto indica que a produção de blastocistos não parece ser efeito do aumento da concentração intracelular de GSH nos zigotos. Apesar do mecanismo que leva a este efeito positivo ainda não ser completamente elucidado, pode-se supor que a GSH extracelular previne peroxidação lipídica das membranas celulares tanto em gametas masculinos como em gametas femininos. Isto se deve à remoção do excesso de ROS no meio para inseminação. Essa função antioxidante da GSH pode melhorar a fecundação e desenvolvimento embrionário subsequente (BOQUEST et al., 1999). Além disso, o efeito da suplementação de meios para inseminação com GSH, pode depender da concentração empregada, bem como variar entre indivíduos (KIM, 1999).

Hipótese

3 HIPÓTESE

A adição do antioxidante Glutationa reduzida (GSH) ao meio para criopreservação confere proteção aos espermatozóides de ovinos submetidos a criopreservação contra danos causados pelo estresse oxidativo.

Objetivo

4 OBJETIVO

O objetivo do presente experimento foi: avaliar se a GSH protege os espermatozóides ovinos criopreservados contra danos causados pelo estresse oxidativo através da avaliação da integridade das membranas plasmáticas e acrossomais, da susceptibilidade do DNA espermático à denaturação, da atividade mitocondrial e da susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo induzido.

Material e Método

5 MATERIAL E MÉTODO

O presente experimento foi conduzido nas instalações da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Campus de Poços de Caldas e no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo , durante os meses de julho e agosto de 2009.

5.1 Animais

Foram utilizados quatro carneiros (*Ovis aries*), adultos, sem raça definida, mantidos em baias com dimensão 3x3m forradas com serragem de maravalha. Recebiam alimentação duas vezes ao dia composta por volumoso (silagem de milho) e feno de gramínea do gênero *cynodon*. Água e sal mineralizado eram fornecidos *ad libtum*.

Todos os animais selecionados estavam em boa condição física (escore de condição corporal médio de 3,5).

5.2 Colheita do sêmen

Duas semanas antes do início do experimento, os animais foram treinados e colocados em regime de colheita de sêmen diária.

As colheitas foram realizadas pelo método de vagina artificial e o manequim utilizado foi uma fêmea ovina sem detecção de estro ou estrogenização prévia para colheita de sêmen por vagina artificial.

A vagina artificial era preparada com água aquecida à 45ºC dentro de mucosa de látex e com tubo de 50mL descartável acoplado.

Apenas um ejaculado de cada animal foi colhido por dia de rotina experimental.

5.3 Processamento do sêmen

Imediatamente após a obtenção de uma amostra, a mesma era analisada a fim de se detectar eventuais alterações macroscópicas, tais como, presença de urina, sangue, ou outros sinais anormais. Em seguida era realizada uma análise microscópica, com a finalidade de qualificação do ejaculado quanto à presença de turbilhonamento e motilidade subjetiva maior ou igual a 70%. Ejaculados que não obedecessem estas premissas seriam descartados.

Os ejaculados obtidos de um animal eram divididos em quatro alíquotas iguais (100µL); as alíquotas foram distribuídas em tubos de ensaio de 15mL. Após esta distribuição, os 4 meios eram lentamente adicionados, e as amostras, acondicionadas a 37°C em banho-maria.

Cada um dos diluidores foi previamente preparado com quatro concentrações diferentes de glutationa reduzida (GSH): 0mM (controle); 1mM; 5mM e 10mM.

Após as alíquotas estarem diluídas com seus respectivos meios, foram envasadas em palhetas de 0,5mL e raqueadas. As mesmas eram submetidas a uma curva de resfriamento de -0,2°C/min até atingirem 5°C em geladeira convencional. Após uma hora de incubação, as raques eram acondicionadas sobre um suporte mantido a 4 centímetros do nitrogênio líquido em caixa de isopor por 20 min. Decorrido este tempo as palhetas eram imersas no nitrogênio e estocadas em botijão criogênico.

As amostras foram descongeladas em duplicidade (para se evitar um possível efeito de palhetas), em banho-maria, com água aquecida à 37ºC por 30”.

Após as descongelação o conteúdo das palhetas era transferido para microtubos de 2,0 mL contendo 1mL de PBS aquecida à 37ºC.

As amostras eram centrifugadas a 800 x g por 5 minutos e foram ressuspensas em PBS para a remoção do diluidor. Este procedimento foi realizado duas vezes antes das amostras serem processadas com a finalidade de isolar possíveis substratos para oxidação, constituintes do meio para criopreservação (p.ex gema de ovo), de modo a prevenir que os resultados fossem mascarados pela peroxidação de lipídios não inerentes aos espermatozóides.

5.4 Avaliações convencionais

As avaliações convencionais empregadas neste trabalho foram: motilidade e vigor e morfologia espermática.

5.5 Avaliação da motilidade espermática

A motilidade foi então classificada, numa escala entre 0 e 100%, segundo a proporção de espermatozóides móveis nos campos observados sob aumento de 100 vezes em microscópio convencional, sendo 0% para nenhum espermatozóide móvel no campo e 100% para todos os espermatozóides móveis.

5.6 Avaliação do vigor espermático

O vigor, foi avaliado quanto ao movimento progressivo retilíneo dos espermatozóides numa escala de 0 a 5, na qual, 0 representa ausência de movimento e 5 representa movimentos progressivos intensos.

5.7 Avaliação da morfologia espermática

A avaliação morfológica dos espermatozóides foi realizada pelo método de câmara úmida; uma alíquota de 5µL de cada amostra do ejaculado *in natura*, foram diluídos em 1995µL de solução de formaldeído-salina (diluição de 1: 400); 15µL de cada amostra já fixada foram colocados sobre lâmina e cobertos com lamínula; a avaliação se deu sob microscopia óptica em aumento de 1000 vezes; 200 células eram computadas e a porcentagem de cada defeito era aferida.

5.8 Testes funcionais

Os testes funcionais utilizados neste experimento foram a avaliação da integridade das membranas acrossomal e plasmática, avaliação da atividade citoquímica mitocondrial e avaliação da integridade da cromatina espermática.

5.9 Avaliação da integridade acrossomal

Visando monitorar os possíveis danos causados durante a congelação das amostras, a técnica da Coloração Simples de Pope (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991) foi utilizada para a avaliação da integridade estrutural da membrana acrossomal. Para tanto, uma alíquota de cada amostra (5µl) foi adicionada ao Corante Simples de Pope (5µl), sendo a mistura incubada por 70 segundos. Após incubação, foram feitos esfregaços sobre lâminas de microscopia, os quais foram analisados em microscópio convencional sob aumento de 1000 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como:

Acrossomo Íntegro: região acrossomal de coloração lilás, levemente mais escura que a região pós-acrossomal;

Acrossomo Não-íntegro: região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara que a região pós-acrossomal.

5.10 Avaliação da integridade da membrana plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizada a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N) segundo Barth e Oko (1989). Nesta coloração, por alterações na permeabilidade das membranas dos espermatozóides, a eosina cora estas células de rosa. Os espermatozóides com membranas íntegras não permitem a entrada do corante, portanto, contrastando com o plano de fundo tomado pela coloração escura da nigrosina, as células aparecem brancas. Desta maneira, uma alíquota de sêmen (5µl) foi misturado ao corante na

proporção de 1:1 e realizados esfregaços sobre lâminas de microscopia. As lâminas foram analisadas em microscópio convencional sob aumento de 1000 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como células com membrana íntegra (não coradas) e não-íntegra (coradas).

5.11 Avaliação da atividade mitocondrial

Segundo Hrudka (1987), a enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) tem um papel fundamental no processo de respiração celular e metabolismo energético das células, além de ser pré-requisito para manutenção das funções osmótica e sintética, motilidade e integridade da estrutura celular. A técnica citoquímica desenvolvida por este autor baseia-se na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, o que inclui a CCO. Através de uma reação em cadeia, o DAB é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, nas mitocôndrias. Esta deposição pode ser identificada através de microscopia convencional pela sua coloração marrom. Desta maneira, é possível descrever o declínio espontâneo da CCO ocasionado por tratamentos físicos e/ou químicos a que os espermatozóides são submetidos.

Para realização desta técnica, uma alíquota de 25 µl de amostra foi incubada com 25 µL de DAB (1mg/ml de PBS), a 37ºC, por uma hora. Após incubação, foram feitos esfregaços em lâmina de vidro e estas fixadas em formol a 10% por 10 minutos. As lâminas foram então lavadas e secas no ar sob proteção da luz.

A atividade citoquímica da mitocôndria espermática foi avaliada segundo descrito por Hrudka (1987). Desta maneira, as lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase, sob aumento de 1000 vezes, em imersão. Foram contados 200 espermatozóides/lâmina e classificados de acordo com a quantidade de corante visualizada na peça intermediária em 4 classes:

1 Classe I: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada, alta atividade mitocondrial (DAB I);

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

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

4 Classe IV: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada, sem atividade mitocondrial (DAB IV).

5.12 Ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA)

Para o Teste de SCSA, foi utilizada metodologia proposta por Evenson et al. (1999). Para isso, uma palheta de sêmen de cada tratamento foi avaliada por citometria de fluxo. Resumidamente, o sêmen foi descongelado em banho-maria (37ºC/30 segundos) e diluído em tampão TNE na concentração de 2 x 106 células/ml. Um volume de 0,1 ml da diluição foi incubado com 0,2 ml de solução detergente (1% de Triton X-100) por 30 segundos para permitir o acesso da LA ao DNA espermático. Após este período o sêmen foi incubado com 0,6ml de solução de LA (6µg/ml). As amostras foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte, com excitação de 488 nm e 15 mW.

A avaliação da LA foi feita baseada na diferença entre a fluorescência emitida pelos espermatozóides com DNA íntegro (dupla fita), que emitem fluorescência verde e os com DNA fragmentado (fita simples), que emitem fluorescência vermelha.

5.13 Avaliação da resistência ao estresse oxidativo

A avaliação foi realizada com base na metodologia proposta por Ohkawa *et al*. (1979), que tem como fundamento a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (MDA), subproduto da peroxidação de lipídeos. Foi empregado um sistema gerador de ROS com posterior mensuração da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) através da espectrofotometria, mensurando-se, portanto, a susceptibilidade das células à peroxidação lipídica.

A cada amostra descongelada, uma alíquota de 400 µl da amostra, foi incubado (90 minutos 37ºC) com o sistema de geração de ROS, já descrito, constituído por ácido ascórbico (20mM) e o sulfato de ferro (4mM).

Após o período de incubação, foram adicionados 1200µL de solução de ácido tricloroacético a 10% (TCA) e centrifugadas por 15 minutos, a 15°C e 5.000g, com a finalidade de separação de proteínas precipitadas.

Alíquotas de 1000µL de sobrenadante foram colocadas em tubos de ensaio juntamente com 1000 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA). Os tubos contendo esta mistura foram incubados em banho-maria (100ºC) por 15 minutos e resfriados imediatamente em banho de gelo, com a finalidade de interrupção da reação termo-dependente.

A concentração de TBARS foi quantificada através de leitura em espectrofotômetro, num comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão, feita previamente, com malondialdeído.

A MDA é uma das principais substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e a concentração de TBARS é determinada utilizando-se o valor 1,56 x 105 x M^{-1} mL^{-1} como coeficiente de extinção molar do malondialdeído. A concentração de TBARS nas amostras foi expressa em nanogramas de TBARS por $1x10^6$ espermatozódes (ng/10^6 sptz).

5.14 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (2000).

Através do aplicativo Guided Data Analisys, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas foram transformados (logarítmo na base 10 – Log_{10} X; Raiz quadrada – RQ X; Quadrado – X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Diferenças significantes para os dados paramétricos foram avaliadas através do teste Least Square Differences (LSD).

Para descrição dos resultados, foram empregados os erros padrões das médias e as médias (média ± erro padrão da média) dos dados originais; e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas: dos dados transformados, quando

necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

A variável classificatória utilizada foi a concentração de GSH (0, 1, 5 e 10mM).

As variáveis resposta motilidade, vigor, porcentagem de células com acrossomo íntegro (ACRO), porcentagem de células com defeitos maiores (DEFMA), menores (DEFME) e totais (DEFTOT) obedeceram às premissas não sendo necessárias transformações.

As variáveis resposta porcentagem de células DAB IV e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico por espermatozóides (TBARS) obedeceram às premissas após a transformação de seus valores para o logaritmo na base 10.

As variáveis resposta porcentagem de células DAB II e III, assim como a porcentagem de espermatozóides com membrana íntegra (VIT) obedeceram às premissas após a transformação de seus valores a raiz quadrada.

As variáveis resposta porcentagem de células DAB I, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico por mL (MDA) e porcentagem de células com fragmentação de DNA (SCSA), obedeceram ás premissas após a transformação de seus valores para o quadrado, o inverso e o inverso da raiz quadrada, respectivamente.

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (concentrações de GSH) para uma determinada variável resposta.

Por serem todas paramétricas, as variáveis resposta foram analisadas através da correlação de Pearson, sendo os resultados expressos através do coeficiente de correlação (r) e seu nível de significância (p).

Resultados e Discussão

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo indicam que não houve efeito do tratamento com GSH sobre as variáveis avaliadas através dos testes funcionais (e.g., motilidade, vigor e defeitos espermáticos; Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GSH (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen ovino criopreservado sobre a motilidade, vigor, defeitos maiores, menores e totais - São Paulo - 2009

	Concentração de GSH			
	Controle	**1 mM**	**5 mM**	**10 mM**
Motilidade (%)	38,44 ± 4,25	29,69 ± 3,75	28,44 ± 3,18	36,56 ± 4,87
Vigor (1-5)	2.97 ± 0,23	2,37 ± 0,24	2,69 ± 0,20	2,94 ± 0,18
Defeitos maiores (%)	5,31 ± 0,45	5,31 ± 0,45	5,06 ± 0,46	4,81 ± 0,46
Defeitos menores (%)	6,44 ± 0,81	6,44 ± 0,81	7,00 ± 0,79	7,56 ± 0,76
Defeitos totais (%)	11,75 ± 0,92	11,75 ± 0,92	12,06 ± 0,91	12,37 ± 0,90

[a, b] Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (LSD, $p<0,05$)

Podemos observar que as amostras tratadas com 5mM de GSH apresentaram menor percentual de células com membranas íntegras quando comparadas com as amostras controle e aquelas tratadas com 10 mM (9,22 ± 1,32, 15,06 ± 2,35 e 18,31 ± 2,15%, respectivamente; Tabela 2). Com relação à variável integridade acrosomal, o emprego das concentrações de 1 e 5 mM de GSH diminuiu a proporção de acrossomas íntegros em relação ao controle (60,40 ± 3,75, 59,09 ± 4,10 e 69,84 ± 2,31%, respectivamente; Tabela 2). Estes resultados, assim como os encontrados para as variáveis avaliadas através dos testes convencionais, contrariaram nossa hipótese de que o tratamento com GSH ao diluidor melhoraria a qualidade espermática pós criopreservação. Uma possível explicação para estes resultados seria que a GSH não estaria envolvida na destruição das ROS relacionadas aos danos causados pela

criopreservação aos acrossomas e membranas. Além disso, os danos ocorridos em acrossomas e membranas, podem não ser resultado da ação das ROS. A injúria observada poderia ser devida à formação de cristais de gelo os quais causariam danos mecânicos às estruturas espermáticas (SARAGUSTY et al., 2009). Neste caso, o tratamento do meio para criopreservação com GSH não forneceria qualquer proteção aos acrossomas e membranas. Além disso, estas estruturas estão sempre em contato com o meio extracelular. O plasma seminal conta com maquinaria enzimática para proteção antioxidante oriunda do epitélio epididimário, principalmente composta pela SOD e Gpx (MARTI et al., 2007). No entanto, para a criopreservação, faz-se necessária a diluição do sêmen com meio extensor o que leva a conseqüente diluição dos antioxidantes presentes. Visto que o principal efeito antioxidante da GSH é como substrato da enzima selênio-dependente Gpx (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989), nas amostras criopreservadas, as baixas concentrações desta enzima seriam um fator limitante para a atuação da GSH. Tal fato seria ainda mais deletério uma vez que o sistema Gpx-GSH seria o responsável pela destruição do peróxido de hidrogênio, evitando assim a formação do radical hidroxila, a ROS mais potencialmente reativa. Talvez o emprego de concentrações maiores que 10mM GSH concomitantemente com a adição de Gpx, exerceria efeito positivo sobre a integridade das membranas e acrossomais.

Quanto à atividade mitocondrial (DAB), os tratamentos não exerceram efeito sobre o percentual de células classe I, II e III. No entanto, o percentual de células sem atividade mitocondrial (DAB IV) foi influenciado pela GSH; o grupo controle apresentou maior porcentagem de células sem atividade quando comparado ao grupo tratado com 10 mM(9,53 ± 1,45 e 6,87 ± 1,40%, respectivamente; Tabela 2). Da mesma forma, as amostras do grupo controle foram mais susceptíveis à denaturação da cromatina quando comparadas com as amostras tratadas com 10 mM de GSH (12,32 ± 1,54 e 6,64 ± 0,62%, respectivamente; Tabela 2). Embora os tratamento com 1 e 5mM não tenham diferido do controle (9,07 ± 1,52, 7,85 ± 1,07 e 12,32 ± 1,54%, respectivamente; Tabela 2) pode-se observar um efeito dose-dependente de GSH sobre a susceptibilidade da cromatina à denaturação, isto é, quanto maior a concentração de GSH utilizada, mais resistentes as células estariam.

O emprego de GSH influenciou positivamente a integridade mitocondrial bem como a resistência da cromatina a desnaturação. Segundo Chaudiere e Ferrari-Iliou (1999), a Gpx é a enzima antioxidante mais abundante em mitocondrias e citoplasma. Assim, o tratamento com GSH foi eficiente nos ambientes com maiores concentrações de Gpx. Resultados semelhantes foram encontrados por Baumber et al. (2003) em amostras espermáticas de garanhões tratadas

com 10mM de GSH. Neste experimento, os autores verificaram, por meio do ensaio cometa, o efeito protetor da GSH sobre o DNA exposto a um sistema de geração de ROS.

Tabela 2 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GSH (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen ovino criopreservado sobre a integridade de membrana (Vitalidade), integridade de acrossomo (ACRO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV) e fragmentação de DNA (SCSA) - São Paulo - 2009

	Concentração de GSH			
	Controle	**1 mM**	**5 mM**	**10 mM**
Vitalidade (%)	15,06 ± 2,35[a]	13,07 ± 1,95[ab]	9,22 ± 1,32[b]	18,31 ± 2,15[a]
ACRO (%)	69,84 ± 2,31[a]	60,40 ± 3,75[b]	59,09 ± 4,10[b]	62,59 ± 2,70[ab]
DAB I (%)	64,12 ± 3,75	69,70 ± 3,58	60,00 ± 5,57	67,09 ± 3,87
DAB II (%)	16,59 ± 1,81	14,73 ± 1,81	20,75 ± 2,61	19,53 ± 2,44
DAB III (%)	9,75 ± 1,24	8,57 ± 1,21	7,31 ± 0,92	6,50 ± 1,01
DAB IV (%)	9,53 ± 1,45[a]	7,00 ± 1,57[ab]	7,00 ± 1,30[ab]	6,87 ± 1,40[b]
SCSA (%)	12,32 ± 1,54[a]	9,07 ± 1,52[b]	7,85 ± 1,07[b]	6,64 ± 0,62[b]

[a, b] Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (LSD, $p<0,05$)

Apesar do efeito aparentemente dose-dependente do tratamento com as diferentes concentrações de GSH sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tanto da produção total como a calculada por espermatozóides (Tabela 3), não foi observado efeito significativo deste tratamento. A técnica de TBARS visa mensurar o subproduto do ataque das ROS a lipídeos, encontrado no ambiente extracelular (NICHI, 2003). Assim, quando este ataque ocorre em componentes de natureza não-lipídica (i.e., proteínas, carboidratos e DNA), ou no meio intracelular, esta técnica por não ser eficiente. Como pudemos verificar na avaliação convencional e funcional do sêmen, a GSH apresentou um efeito benéfico, apenas para a atividade mitocondrial e para a susceptibilidade da cromatina espermática à denaturação, variáveis relacionadas ao meio intracelular. Desta forma, baseando-se nestes resultados e na ausência de efeitos da GSH nas TBARS, podemos inferir que, nas amostras criopreservadas de ovinos, o estresse oxidativo foi mais importante no meio intracelular.

Tabela 3 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GSH (1mM, 5mM e 10mM) sobre a produção total de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, ng/mL) e sobre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, ng/10^6 sptz) em sêmen ovino criopreservado submetido ao desafio oxidativo pelo ascorbato e o sulfato de ferro - São Paulo - 2009

	Concentração de GSH			
	Controle	**1 mM**	**5 mM**	**10 mM**
TBARS (ng/mL)	1292,9 ± 252,6	1213,7 ± 117,8	1145,1 ± 107,2	883,1 ± 54,3
TBARS (ng/10^6 sptz)	19,99 ± 5,27	16,12 ± 2,18	15,15 ± 2,29	11,23 ± 1,66

[a, b] Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (LSD, $p<0,05$)

Foi observada uma correlação positiva (r=0,35, p=0,02; Tabela 4) entre TBARS (ng/10^6 sptz) e SCSA. Apesar de, a primeira vista, este resultado levar a crer que houve uma correlação entre estresse oxidativo e fragmentação de DNA, é importante salientar que ambas as técnicas, submetem os espermatozóides à um desafio, não representando valores reais e fisiológicos. Este resultado indica que células mais susceptíveis ao estresse oxidativo seriam mais propensas a lesões em DNA.

Uma explicação para as correlações negativas encontradas entre a porcentagem de células com membrana íntegra tanto com TBARS (ng/10^6 sptz; r=-0,39, p=0,02; Tabela 4) como com SCSA (r=-32, p=0,03; Tabela 4) seria que células com membrana lesada estariam mais propensas ao ataque das ROS e também, a lesão da cromatina. Além disso, verificou-se fortes correlações entre células com membrana íntegra e atividade mitocondrial (DAB I: r=0,51, p=0,0002; DAB II: r=-0,38, p=0,0092; DAB III: r=-0,37, p=0,014 e DAB IV: r=-0,35, p=0,017; Tabela 4). Uma hipótese para explicar estes resultados seria as mitocôndrias de células com membrana lesada estariam mais sujeitas a lesões, o que levaria a liberação de fatores pró-oxidativos e pró-apoptóticos. Caso estas células sejam submetidas a um estresse adicional, ocorreria um ataque mais agressivo ao DNA e mesmo a células vizinhas. Da mesma forma, Blumer et al. (2007) também verificaram uma relação entre fragmentação de DNA e atividade mitocondrial defectiva. Segundo estes autores, existe a uma estreita relação entre a disfunção da atividade mitocondrial causada pelo estresse oxidativo e a fragmentação de DNA.

Verificou-se que a motilidade correlacionou-se com a porcentagem de células DAB III (r=-0,36, p=0,015) e com a porcentagem de células com membrana íntegra (r=0,45, p=0,0013). Isto comprovaria a influência negativa da atividade mitocondrial altamente comprometida, possivelmente exacerbada pela lesão de membrana que, por sua vez, levaria a decréscimo da motilidade. Da mesma forma, as correlações encontradas entre vigor e motilidade com o SCSA (r=-0,35, p=0,016 e r=-0,29, p=0,047, respectivamente), indicariam que células com comprometimento da cromatina, possivelmente causado pelos eventos citados anteriormente, apresentariam lesões oxidativas tão extensas que levariam então, a diminuição de motilidade e vigor. Estes resultados indicam que, provavelmente, a lesão de cromatina seria um dos últimos eventos causados pelo estresse oxidativo.

Tabela 4 – Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; ng/mL e ng*10^6), fragmentação do DNA (SCSA), espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), espermatozóides com membrana plasmática íntegra (Vivos), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), defeitos espermáticos maiores (DEFMA) e menores (DEFME), Motilidade (MOT) e Vigor (VIG) de amostras espermáticas de cães, coletadas através de manipulação digital e criopreservadas com diferentes concentrações de GSH (0; 1, 5 e 10mM) – São Paulo– 2009

	TBARS (ng/10^6 sptz)	SCSA	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	Vivos	POPE	DEFMA	DEFME	VIG	MOT
TBARS (ng/ml)	0,52 (0,0002)	-0,17 (0,25)	-0,20 (0,18)	0,13 (0,39)	0,39 (0,008)	0,27 (0,07)	-0,26 (0,08)	-0,16 (0,29)	0,14 (0,35)	0,17 (0,26)	-0,22 (0,13)	-0,24 (0,093)
TBARS (ng/10^6 sptz)		0,35 (0,02)	-0,21 (0,17)	0,14 (0,38)	0,14 (0,38)	0,23 (0,14)	-0,36 (0,02)	-0,26 (0,09)	0,24 (0,11)	0,13 (0,39)	-0,21 (0,17)	-0,37 (0,014)
SCSA (%)			0,017 (0,91)	-0,08 (0,59)	-0,12 (0,4435)	0,002 (0,99)	-0,32 (0,03)	-0,08 (0,59)	-0,006 (0,97)	0,15 (0,32)	-0,35 (0,016	-0,29 (0,047)
DAB I (%)				-0,82 (<,0001)	-0,71 (<,0001)	-0,70 (<,0001)	0,51 (0,0002)	-0,06 (0,70)	-0,25 (0,09)	-0,39 (0,0074)	0,03 (0,82)	0,21 (0,16)
DAB II (%)					0,29 (0,06)	0,34 (0,018)	-0,38 (0,0092)	0,02 (0,88)	0,26 (0,08)	0,17 (0,26)	-0,003 (0,98)	-0,13 (0,39)
DAB III (%)						0,67 (<,0001)	-0,37 (0,014)	-0,10 (0,52)	0,06 (0,68)	0,17 (0,26)	-0,22 (0,15)	-0,36 (0,015)
DAB IV (%)							-0,35 (0,017)	0,21 (0,16)	0,09 (0,55)	0,49 (0,0005)	-0,12 (0,40)	-0,24 (0,097)
Vivos (%)								0,18 (0,23)	-0,02 (0,88)	-0,08 (0,56)	0,27 (0,062)	0,45 (0,0013)
POPE (%)									0,05 (0,74)	0,35 (0,015)	-0,14 (0,36)	0,017 (0,91)
DEFMA (%)										-0,01 (0,94)	-0,12 (0,39)	0,02 (0,90)
DEFME (%)											0,008 (0,96)	0,06 (0,66)
VIG (1-5)												0,66 (<,0001)

Conclusão

7 CONCLUSÃO

A adição do antioxidante Glutationa reduzida (GSH) confere proteção ao DNA e à atividade mitocondrial de espermatozóides de ovinos submetidos a criopreservação contra danos causados pelo estresse oxidativo.

Referências

REFERÊNCIAS

AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURINO, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v. 50, n. 3, p .239-249, 2005.

ANEL, L.; DE PAZ, P.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C. A.; BOIXO, J. C.; MANSO, A.; GONZALEZ, M.; KAABI, M.; ANEL, E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram sêmen. **Theriogenology**, v.60, n. 7, p.1293-1308, 2003.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development,** v. 35, n. 3, p. 302-315, 1993.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 98, n. 1, p. 257-265, 1993.

ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; LAUGHTON, M. J.; QUINLAN, G. J.; GUTTERIDGE, J. M. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. **The Biochemical Jornal**, v. 258, n. 2, p. 617-620, 1989.

BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em semen resfriado de gato-do-mato-pequeno (Leopardus tigrinus, SCHREBER, 1775)**, 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

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

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2003.

BILODEAU, J. F.; PATENAUDE, A.; PIEDBOEUF, B.; CARRIER, C.; PETROV, P.; FAURE, R.; MIRAULT, M. E. Glutathione peroxidase-1 expression enhances recovery of human breast carcinoma cells from hyperoxic cell cycle arrest. **Free Radical Biology** and **Medicine**, v. 33, n. 9, p. 1279-1289, 2002.

BLUMER, C. G.; FARIELLO, R. M.; RESTELLI, A. E.; SPAINE, D. M.; BERTOLLA, R. P.; CEDENHO, A. P.Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 5, p. 1716-1722, 2007.

BOQUEST, A. C.; ABEYDEERA, L. R.; WANG, W. H.; DAY, B. N. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. **Theriogenology**, v. 51, n. 7, p. 1311-1319, 1999.

CHAUDIERE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 949-962, 1999.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptbility to cold-shock. **Cryobiology**, v.14, n. 1, p.466-470, 1977.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 3, p. 484-495, 1999.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; DE ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

GRIVEAU, J. F.; DUMONT, E.; RENARD, P.; CALLEGARI, J. P.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, n.1, p.17-26, 1995.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**, Editora Manole, p.381-382, 2004.
HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Editora Oxford, p. 543, 1989.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on induction of plasma membrane damage in cryopresrved ram spermatozoa. **Biology of reproduction**, v51, n. 1, p.414-424, 1994.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**,v.62, n. 3, p.3-22, 2000.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology, the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.47-58, 2000.

JIMÉNEZ, F. M.; PUCHADES, S.; MOCÉ, E.; VINDES-DE-CARTRO, M. P.; VICENTE J. S.; RODRIGUEZ, M. Use of powdered egg yolk vs fresh egg yolk for the cryopreservation of ovine semen. **Reproduction Domestic Animals**, v.39, n. 6, p. 438-441, 2004.

KIM, I. H.; VAN-LANGENDONCKT, A.; VAN-SOOM, A.; VANROOSE, G.; CASI, A. L.; HENDRIKSEN, P. J. M.; BEVERS, M. M. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 52, n. 1, p. 537-547, 1999.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.

MARTI, E.; MARA, L.; MARTI, J. I.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J. A. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 67, n. 9, p. 1446-1454, 2007.

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; FARRANT, J.; CHU, E. H. Y.; HANNA, M. J. Interaction of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cell. **The Frozen Cell**, v. 16, n. 5, p. 69-85, 1970.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003, 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 3, p. 351-358, 1979.

OLLERO, M.; PEREZ-PE, R.; MUNIÑO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J. A. Improovement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by heterogeneit análisis. **Cryobiology**, v.37, n. 1 p.1-12, 1998.

PAYNE, R.; OLIVER, J. E.; UPRETTI, G. C. Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. **Cryobiology**, v.31, n. 2, p.180-184, 1994.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

PURDY, P. H. The post-thaw quality of ram sperm held for to 48h at 5ºC prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.93, n. 1, p.114-120, 2005.

RUDOLPH, A. S.; CROWE, J. H. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. **Cryobiology**, v. 22, n. 4, p. 367-377, 1985.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M .C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1, p.77-111, 2000.

SARAGUST, J.; GACITUA, H.; ROZENBOIM, I.;ARAV, A. Protective effects of iodixanol during bovine sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1425-1432, 2009.

VALLERIOTE, P. S.; DIAS, A. J. B.; PAES DE CARVALHO, F.; PAES SOBRINHO, C. Criopreservação de sêmen ovino em solução de trealose. **Anais SBTE**, v.33, p.310, 2005.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. **The effects of low temperatures on biological elements**, v. 1, n. 1, p.189-218, 1981.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.7, n. 4, p.871-891, 1995.

WATSON, P. F.; MAXWELL, W. M. C. Recent progress in preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, n. 1, p.55-65, 1996.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 61, n. 1, p.481-492, 2000.