Marcilio Nichi

Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros

São Paulo
2009

Marcilio Nichi

Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador
Profa. Dra. Valquiria Hyppolito 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.2191
FMVZ

Nichi, Marcilio
Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros / Marcilio Nichi. – 2009.
120 f. : il.

Tese (Doutorado) - 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: Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe.

1. Radicais livres. 2. Sêmen. 3. Antioxidantes. 4. Bovino. 5. Epidídimo. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Nichi, Marcilio

Título: Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ___/___/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do tratamento antioxidante e de ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros *Bos taurus taurus*", protocolado sob o nº1034/2006, utilizando 30 (trinta) bovinos (peças de matadouro), sob a responsabilidade do Profa. Dra. Valquiria Hyppolito 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 12/12/06".

(We certify that the Research "Effect of treatment with antioxidant and poly-unsaturated fatty acids on spermatic samples collected from epididymis of *Bos taurus taurus* bulls", protocol number 1034/2006, utilizing 30 (thirty) bovines, under the responsibility Profa. Dra. Valquiria Hyppolito 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 the day 12/12/2006).

São Paulo, 13 de dezembro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
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

Dedicatória

Dedico,

A meus pais, Ademar e Leiko, meu exemplo de integridade, honestidade, amor ao próximo, responsabilidade e profissionalismo. Tudo o que eu faço, é pensando em deixá-los orgulhosos. Todo que sou, eu devo a vocês.

A meu irmão Marcelo, por me ajudar de todas as formas que um ser humano pode ajudar a outro e me ensinar o verdadeiro significado da palavra Irmão,

A meu irmão Maurício, pois mesmo com todas as dificuldades da vida sempre me proporcionou amizade, carinho e amor.

À minha cunhada Sílvia , pela amizade e carinho com que sempre me recebeu.

A meu sobrinho Vitor, que ele se mire no exemplo dos avós e dos pais.

A meus avós e antepassados, por olharem por mim, mesmo que eu não consiga enxerga-los.

A Deus, por me proporcionar tudo, principalmente os acontecimentos ruins, com os quais eu procuro aprender a ser uma pessoa melhor.

A todos vocês, por serem o vento sobre minhas asas, dedico esta tese.

Agradecimentos

Mais uma etapa que se finda. Muitos acontecimentos bons, alguns ruins. Muitas amizades novas, algumas se tornando mais fortes, outras mais distantes, mas nenhuma deixada para trás. Muito aprendizado e muito trabalho, mas nunca se esquecendo de viver a vida. Esta é a oportunidade para eternizar o agradecimento a todos os que permitiram estes momentos. Para mim, este é o momento mais difícil. Tantas pessoas, tantos sentimentos, tão pouco espaço. Mas para as pessoas citadas aqui, e para todos os que eu, por ventura, esqueça de citar, ainda temos toda a vida para que eu possa agradecer, não com palavras, mas com gestos e atitudes. Um dia alguém me disse que amizade não se agradece, mas de qualquer forma, muito obrigado.

Ao Professor Renato Campanarut Barnabe e à Professora Valquiria Hyppolito Barnabe, meus mais sinceros e profundos agradecimentos, não só pela orientação, mas por me receberem como a um filho, sempre com palavras de carinho, confiança, respeito e afeto.

À Professora e amiga Carmen Neusa Martins Cortada, que mesmo à distância, continua sempre me orientando em todos os aspectos de minha vida.

À Doutora Roberta Mara Züge, não só por me apresentar ao mundo da pesquisa me proporcionado o prazer de trabalhar com o que gosto, mas pela amizade fraternal, carinho e confiança.

Á equipe do laboratório de LA que permitiu que esse trabalho fosse possível sempre com risos, muito trabalho e amizade, Profa. Valquiria, Prof. Renato, Eduardo Brau, Cabral, Paola, Rodrigo, Andressa, Sílvia Crusco, Mariana, Patrícia, Pedro, Felipe. Sem vocês, realmente este momento nunca teria sido possível e este caminho não teria sido tão prazeroso.

À equipe formada pelos alunos de Medicina Veterinária da PUC da PUC Minas campus Poços de Caldas.

Aos friends, Camila, Marcella, Weber e Rodrigo, por todos os jantares, cookies e muffins.

À Comissão de Churrascos do VRA, da qual sou presidente, agradeço aos membros Paulo, Henderson, Camila, Mayra, Camilla, Marcelo Febem, Rodrigo, Giuliano, Gabriel e Zé Nélio.

Às crianças do VRA, Luis Felipe (Xim), João Guilherme, Laura, João Pedro, Maria Clara, Christian Jr., por me inspirarem a lutar por um mundo melhor.

A Paola, por me ajudar mesmo que, muitas vezes, eu não faça por merecer.

A toda a família Matsushita, por me darem um exemplo de união e amor que eu tento empregar em minha vida.

Aos meus tios e primos, tia Alice, tio Kenji, tio Xigue, tia Sueli, tio Sato, tia Nely, tia Dina, Gi, tio Tamo, tia Alice, Paula, Marcio, Shigeo, Renato.

Aos amigos que fiz na vida acadêmica e que se transformaram em amigos que fiz para a vida toda, Ricardo Bertolla, Thiesa, Lílian, Ricardo Xoiu, Eduardo Brau, Sobrinho, Karina, Paola, Ana Paula, Mariana Rodrigues, Patrícia, Andressa, Lindsay, Zeca, Paulo, Henderson, Robertinha, Gabriel, Zé Nélio, Manoel, Daniela, Rita, Camilla, Renata Simões, Manuela, Cíntia, Cris Lúcio, Liege, Marcão, Alessandra, Flávia, Mariana Xubada, Mariana Groke, Everton, Júlia, Marco Vaca, Mariana Giasseti, Fabíola, Marcelo Febem, Luciana, Márcio, Nélcio, Rogério, Graciana, Andréa, Viviane, Carla Belli, Eduardo, Regina, Thais, Gutinho, Everton.

À antiga diretoria, Márcio, Snarf, Cabral, Nélcio e Edu.

Aos amigos de Mogi, Betão, Magnus, Carla, Pietro, Rogério, Ludmila, Letycia, Laryssa, Edna, Beto, Mayra, Flaiton, Leandro Mattos, Guilherme, Lucas, Fátima, Manoel, Victor, Duzão, Rafa, Marisa, Leandro Batata, Lauro Lima, Carlos Eduardo (Charuto), Marcelus, Hélio, Lúcia, Larissa, Miranda, Fábio Giba, Ique Mattos, Ique Amoedo, Vetoratto, Davi (Brutus), Marcelo Bridi, Márcio Panguá, Michel, Nanci, Nelsinho, Gabriel, Eduardo Zirda, Duzinho, Alan.

Às amigas Thais, Harumi, Dona Sílvia, Miguel e Maria Amélia pela ajuda de sempre.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi, Profa. Dra. Camila Infantosi Vannucchi, Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira, Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes, Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Prof. Dr. José Antônio Visintin, Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, Prof. Dr. Mário Binelli, Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, Prof. Dr. Wilson Gonçalvez Vianna e Prof. Dr. Laudinor De Vuono.

Aos professores Wilson Roberto Fernandes, Carla Belli, Ângelo João Stopiglia, Luis Cláudio Lopes C. da Silva, Eduardo Harry Birgel Júnior, Prof. Dr. Fernando José Benesi, pela amizade.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Reprodução Animal, Alice, Jocimar, Irailton, Luiz, Belau.

À todos os funcionários da biblioteca, principalmente a Maria Fátima dos Santos e a Elza Faquim por toda a presteza e carinho com que atendem a todos os pós-graduandos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no nome de seu diretor, Prof. Dr. José Antônio Visintin.

À Nutricell, por fornecer os meios de criopreservação.

À Faculdade de Medicina Veterinária da PUC Minas campus Poços de Caldas, em nome do coordenador do curso, Prof. Dr. Domingos Marcelo Cenachi Pesce e do Prof. Dr. Carlos Henrique Cabral Viana, por permitir a realização de parte do experimento em suas instalações.

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP), por fornecer a bolsa com a qual seria impossível a conclusão deste experimento.

Epígrafe

Ando devagar porque já tive pressa
Levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei
Eu nada sei
Conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs,
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir
Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou
Estrada eu sou
Conhecer as manhas e as manhãs,
O sabor das massas e das maçãs,
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir
Todo mundo ama um dia.
Todo mundo chora
Um dia a gente chega
e no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz
Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir
Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
De ser feliz

(Almir Sater / Renato Teixeira)

NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros**. [Effect of antioxidant and poli-unsaturated fatty acids on epididymal sperm in bulls]. 2009. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Amostras espermáticas provenientes do epidídimo podem ser utilizadas com diversas finalidades tais como: modelo experimental para pesquisa com sêmen, aproveitamento do sêmen de animais de alto valor genético que vierem a óbito e possibilidade da coleta e aproveitamento do sêmen de animais em perigo de extinção. No entanto, para a utilização desta técnica é necessário o estudo de diversos fatores que poderiam influenciar sua eficiência, como por exemplo, as formas de armazenamento dos testículos, efeitos da criopreservação, diluidores utilizados, entre outros. O presente estudo teve como objetivos: 1- determinar a temperatura mais adequada para o armazenamento do testículo após o abate do animal (4 ou 34ºC) levando-se em consideração testes funcionais e fecundação *in vitro*; 2- avaliar o efeito desta temperatura de armazenamento no sêmen epididimário fresco e criopreservado e; 3- verificar a eficiência do tratamento com ácido decosaexanóico (DHA) e antioxidantes adicionados ao diluidor. Para isso, amostras espermáticas foram coletadas da cauda do epidídimo de touros provenientes de abatedouros. Para testar o efeito da temperatura de acondicionamento dos testículos, os mesmos foram armazenados entre 2 e 4 horas após o abate, à temperatura de 4 ou 34º C. O sêmen foi então coletado da cauda do epidídimo, submetido ou não à criopreservação e avaliado quanto a análise computadorizada da motilidade espermática (CASA), integridade de membrana e potencial mitocondrial (iodeto de propídeo, SYBR e JC1), fertilização *in vitro* e susceptibilidade ao estresse oxidativo (TBARS). Visto que os resultados deste experimento indicaram que a temperatura de 4ºC era a mais indicada, a mesma foi utilizada para a avaliação do efeito da suplementação com DHA e antioxidantes adicionados ao diluidor. Nesta fase, o sêmen foi avaliado quanto à integridade de membrana e acrossomo (eosina/nigrosina e *fast green*/rosa bengala, respectivamente), atividade mitocondrial (diaminobenzidina), integridade do DNA (ensaio da estrutura da cromatina espermática – SCSA) e susceptibilidade ao estresse oxidativo (TBARS). Os resultados do presente estudo indicam que o tratamento com o DHA tornou os espermatozóides mais susceptíveis aos danos causados pelo estresse oxidativo. Por outro lado, resultados diversos foram encontrados com a associação entre DHA e antioxidantes. A associação entre DHA e superóxido dismutase (SOD) e DHA e glutationa reduzida (GSH) apresentaram os melhores resultados em relação à motilidade espermática e à integridade de

membrana, respectivamente. No entanto, o DHA, quando associado à Vitamina E, apresentou resultados negativos para a atividade mitocondrial. Os resultados do presente estudo indicam que o tratamento com DHA e SOD ou DHA e GSH em amostras espermáticas coletadas de epidídimos armazenados a 4ºC por até 4 horas, pode melhorar a qualidade espermática pós criopreservação.

Palavras-chave: Radicais livres. Sêmen. Antioxidantes. Bovino. Epidídimo.

NICHI, M. **Effect of antioxidant and poli-unsaturated fatty acids on epididymal sperm in bulls.** [Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros]. 2009. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Sperm recovery from the cauda epididymis can be very advantageous, for example: in case of the unexpected death of a genetically highly valuable animal, as an experimental model for research on semen and for the use in endangered species. However, the efficiency of this technique demands the study of several issues such as the storage conditions of the testicles prior semen collection, the effects of cryopreservation and semen extenders, among others. The objective of the present study was: 1- to evaluate the ideal temperature for testicles storage after slaughter (4 or 34ºC) based on functional tests and on *in vitro* fertility; 2- to evaluate the effect of storage temperature on fresh and cryopreserved semen samples, and; 3- to test the addition of decosaexanoic acid (DHA) and antioxidants to the semen extender. Sperm samples were collected from the caudae epididymides of testicles collected from abattoirs. To test the effect of temperature of storage, testicles were kept under 4 or 34ºC, between two to four hours after slaughter. Semen was then collected from the caudae epididymides and cryopreserved or not. Samples were then evaluated for computer assisted sperm analysis (CASA), membrane integrity and mitochondrial potential (propidium iodide, SYBR and JC1), *in vitro* fertilization outcomes, and susceptibility to the oxidative stress (TBARS). Results of this study indicated that, with no doubt, storage of testicles under 4ºC is the most appropriate in order to improve post-thaw sperm quality and *in vitro* fertility. Therefore, this temperature was used in the rest of the study to test the effect of DHA and antioxidant treatments to the semen extender. In this part of the study, semen was evaluated for membrane and acrosome integrities (eosin/nigrosin and fast green/bengal rose stain, respectively), mitochondrial activity (diaminobenzidine stain), DNA integrity (sperm chromatin structure assay – SCSA) and, sperm susceptibility to the oxidative stress (TBARS). Results of the present study indicate that due to the treatment with DHA, epididymal sperm became more susceptible to the oxidative stress. On the other hand, different results were found regarding the association between DHA and antioxidant. The association between DHA and superoxide dismutase (SOD) and between DHA and reduced glutathione (GSH) showed better results on sperm motility and membrane integrity, respectively. On the other hand, when associated to the Vitamin E, the DHA showed poor results on mitochondrial activity. Results of the present study indicate that the treatment with DHA and SOD or GSH to

epididymal sperm samples collected from testicles stored at 4ºC for up to 4 hours, may improve post-thaw sperm quality.

Keywords: Free radicals. Semen. Antioxidants. Bovine. Epididymides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Movimento esquemático do espermatozóide avaliado pelo CASA..... 43

Figura 2 - Análise de correlação entre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ng/10^6espermatozóides) e a porcentagem de espermatozóides com gotas citoplasmáticas distais ($p<0,05$) em amostras de epidídimo armazenadas a 4ºC – Antuérpia – Bélgica - 2005..... 61

Figura 3 - Análise de correlação entre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ng/10^6espermatozóides) e a porcentagem de espermatozóides com gotas citoplasmáticas proximais ($p<0.05$) em amostras de epidídimo armazenadas a 4ºC - Antuérpia - Bélgica - 2005..... 61

Figura 4 - Efeito da temperatura de armazenamento de epidídimos bovinos (4 versus 34ºC) nas variáveis avaliadas com o CASA e na avaliação concomitante da integridade de membrana e atividade mitocondrial (SYBR-PI e JC-1) de amostras espermáticas epididimárias – Gent – Bélgica - 2006..... 64

Figura 5 - Efeito da criopreservação (Pré versus Pós) nas variáveis avaliadas com o CASA e na avaliação concomitante da integridade de membrana e atividade mitocondrial (SYBR-PI e JC-1) de amostras espermáticas epididimárias – Gent – Bélgica - 2006..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito da temperatura de armazenamento de epidídimos bovinos (4 e 34ºC) nos níveis médios (± erro padrão da média -EPM) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) produzidos por espermatozóides epididimários submetidos ao desafio oxidativo, e na porcentagem de gotas proximais, distais e totais – Antuérpia – Bélgica - 2005..... 59

Tabela 2 - Efeito da temperatura de armazenamento de epidídimos bovinos (4 e 34ºC) na capacidade fecundante *in vitro* de espermatozóides epididimários, reveladas pela proporção de blastocistos iniciais, normais, expandidos e eclodidos avaliados no dia 7 após fecundação – Antuérpia – Bélgica - 2005..... 60

Tabela 3 - Efeitos da temperatura de armazenamento de epidídimos (4 vs 34ºC), da criopreservação (pré vs pós) e da interação temperatura x criopreservação nas variáveis avaliadas pela análise espermática computadorizada (CASA) e na análise concomitante da integridade da membrana e da atividade mitocondrial (SYBR-PI e JC-1) de amostras espermáticas criopreservadas de epidídimo – Gent – Bélgica - 2006..... 62

Tabela 4 - Efeito da temperatura de armazenagem do epidídimo (4 ou 34ºC) nas variáveis avaliadas pelo CASA antes e após a criopreservação de amostras espermáticas coletadas da cauda do epidídimo – Gent – Bélgica - 2006..... 63

Tabela 5 - Correlações observadas entre as variáveis avaliadas pelo CASA e as avaliadas através da coloração tripla (SYBR-PI e JC-1) em amostras espermáticas epididimárias armazenadas a 4ºC antes e após a da criopreservação ($p<0.05$) – Gent – Bélgica - 2006..... 66

Tabela 6 - Correlações observadas entre as variáveis avaliadas pelo CASA e as avaliadas através da coloração tripla (SYBR-PI e JC-1) em amostras espermáticas epididimárias armazenadas a 34ºC antes (a) e após (b) a criopreservação ($p<0.05$) – Gent - Bélgica - 2006..... 66

Tabela 7 - Efeito da temperatura de armazenagem do epidídimo (4 ou 34ºC) na fecundidade *in vitro* e na resistência dos espermatozóides ao estresse oxidativo (TBARS) após a criopreservação do sêmen epididimário – Gent – Bélgica - 2006..... 67

Tabela 8 - Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta porcentagens de blastocistos iniciais, normais, expandidos, eclodidos e totais, concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), características de motilidade avaliadas pelo CASA, resultados da coloração tripla (SYBR/IP/JC1) de amostras espermáticas criopreservadas coletadas de epidídimos armazenados a 4ºC – Gent – Bélgica - 2006..... 69

Tabela 9 - Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta porcentagens de blastocistos iniciais, normais, expandidos, eclodidos e totais, concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS),

características de motilidade avaliadas pelo CASA, resultados da coloração tripla (SYBR/IP/JC1) de amostras espermáticas criopreservadas coletadas de epidídimos armazenados a 34ºC - Gent - Bélgica - 2006..... 69

Tabela 10 - Efeito da concentração de Catalase, Superóxido Dismutase (SOD) e Glutationa Peroxidase (GPx) nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V), susceptibilidade do DNA à denaturação (DNA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009..... 71

Tabela 11 - Efeito da concentração de combinação entre glutationa peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V), susceptibilidade do DNA à denaturação (DNA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009..... 72

Tabela 12 - Efeito da concentração de Glutationa (GSH) nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V), susceptibilidade do DNA à denaturação (DNA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009..... 73

Tabela 13 - Efeito da concentração de Vitamina C nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009..... 74

Tabela 14 - Efeito da concentração de Vitamina E nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V), susceptibilidade do DNA à denaturação (DNA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo – 2009..... 75

Tabela 15 - Efeito da concentração de combinação das Vitaminas C e E nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V), susceptibilidade do DNA à denaturação (DNA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo -2009... 76

Tabela 16 - Efeito da concentração de ácido decosa-hexanóico (DHA) nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V) e substâncias reativas ao ácido

tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009..... 77

Tabela 17 - Efeito da concentração de ácido decosa-hexanóico (DHA) associado a antioxidantes glutationa peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), combinados ou não, nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo – 2009..... 78

Tabela 18 - Efeito da concentração de ácido decosa-hexanóico (DHA) associado as vitaminas C e E, combinadas ou não, nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009..... 79

Tabela 19 - Efeito da concentração de ácido decosa-hexanóico (DHA) associado a antioxidantes glutationa reduzida (GHS) e glutationa peroxidase (GPx), combinados ou não, nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009..... 80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Abreviações e significados das variáveis analisadas pelo CASA (adaptado de Goovaerts et al., 2006)..... 43

Quadro 2 - Antioxidantes e quantidades utilizadas na fase 1..... 51

Quadro 3 - Combinações antioxidantes utilizadas na fase 2..... 51

LISTA DE SIMBOLOS

DNA	ácido desoxirribonucléico
PUFAs	ácidos graxos poli-insaturados
NAHDP	adenosina difosfato de sódio
α	Alfa
O_2^-	ânion superóxido
B	Beta
CCO	Complexo cumulus oócitos
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
º	Graus
ºC	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..... 23

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 26

2.1 *Sêmen de epidídimo*..... 26

2.2 *Estresse oxidativo no sêmen*..... 27

2.3 *Antioxidantes*..... 28

2.4 *Ácidos graxos poli-insaturados*..... 30

3 HIPÓTESE..... 33

4 OBJETIVOS..... 35

5 MATERIAL E MÉTODO..... 37

5.1 *Experimento 1*..... 37

5.1.1 **Epidídimos**..... 37

5.1.2 **Amostras espermáticas de epidídimo**..... 38

5.1.3 **Processamento do sêmen**..... 38

5.1.4 **Fecundação *in vitro***..... 39

5.1.5 **Resistência do espermatozóide ao estresse oxidativo.**..... 39

5.1.6 **Análise Estatística**..... 40

5.2 *Experimento 2*..... 41

5.2.1 **Epidídimos**..... 41

5.2.2 **Coleta do sêmen**..... 42

5.2.3 **Análise computadorizada da motilidade (CASA)**..... 42

5.2.4 **Análise da integridade da membrana e do potencial mitocondrial espermáticos**..... 44

5.2.5 **Processamento e criopreservação do sêmen**..... 45

5.2.6 **Análise Estatística**..... 45

5.3 *Experimento 3*..... 46

5.3.1 **Epidídimos**..... 46

5.3.2 **Coleta do sêmen**..... 47

5.3.3 **Processamento e criopreservação do sêmen**..... 47

5.3.4 **Fecundação *in vitro***..... 47

5.3.5 **Resistência do espermatozóide ao estresse oxidativo**..... 47

5.3.6 **Análise Estatística**..... 48

5.4 *Experimento 4*..... 48

5.4.1 **Epidídimos**..... 49

5.4.2 **Coleta do sêmen**..... 49

5.4.3 **Tratamentos**..... 50

5.4.4 **Criopreservação**..... 51

5.4.5 **Descongelação do sêmen**..... 52

5.4.6 **Testes Convencionais**..... 52

5.4.7 **Testes Funcionais**..... 52

5.4.7.1 Integridade Acrossomal..... 52

5.4.7.2 Integridade da membrana plasmática..... 53

5.4.7.3 Atividade Mitocondrial..... 53

5.4.7.4 Ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA)..... 54

5.4.8 **Resistência ao estresse oxidativo**..... 55

5.4.9 **Análise Estatística**..... 55

6 RESULTADOS..... 59

6.1 *Resultados - Experimento 1*..... 59

6.2 *Resultados - Experimento 2*..... 62

6.3 *Resultados - Experimento 3*..... 67

6.4 *Resultados - Experimento 4*..... 70

6.4.1 **Efeitos dos antioxidantes enzimáticos**..... 70

6.4.2 **Efeitos dos antioxidantes não-enzimáticos**..... 72

6.4.3 **Efeito do Ácido Decosa-hexanóico (DHA) e antioxidantes**..... 76

7 DISCUSSÃO..... 82

7.1 *Discussão - Experimento 1*..... 82

7.2 *Discussão - Experimento 2*..... 86

7.3 *Discussão - Experimento 3*..... 89

7.4 *Discussão - Experimento 4*..... 91

7.4.1 **Efeitos dos antioxidantes enzimáticos**..... 92

7.4.2 **Efeitos dos antioxidantes não-enzimáticos**..... 93

7.4.3 **Efeito do Ácido Decosa-hexanóico (DHA) e antioxidantes**..... 96

7.5 *Considerações Finais*..... 98

8 CONCLUSÕES..... 102

8.1 *Conclusões Experimento 1*..... 102

8.2 *Conclusões Experimento 2*..... 102

8.3 *Conclusões Experimento 3*..... 103

8.4 *Conclusões Experimento 4*..... 103

REFERÊNCIAS..... 105

ANEXOS..... 117

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Uma das maiores limitações da aplicação de biotécnicas reprodutivas é a perda de qualidade do sêmen após a criopreservação. O processo de resfriamento, congelação e descongelação induzem um estresse físico e químico na estrutura espermática, o que reduz a viabilidade e a habilidade fecundante. Tanto o choque frio como os danos causados pela congelação estão associados às espécies reativas de oxigênio (ROS) e à geração do estresse oxidativo (WANG et al., 1997; CHATTERJEE; DE LAMIRANDE; GAGNON, 2001).

Os espermatozóides são particularmente susceptíveis ao ataque das ROS por possuírem altas quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) em suas membranas e pela quantidade limitada de citoplasma. Os PUFAs melhoram a fluidez da membrana mas tornam os espermatozóides mais susceptíveis aos danos oxidativos. O citoplasma reduzido, por sua vez, limita a quantidade de antioxidantes, principalmente os de ação enzimática. O ataque das ROS aos espermatozóides leva a danos a lipídeos, proteínas, carboidratos e material genético, causando perda irreversível da motilidade espermática (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992), redução da fusão espermatozóide-oócitos (MAMMOTO et al., 1996), alteração do citoesqueleto (HINSHAW et al., 1986) e danos de DNA (AITKEN et al., 1998).

A utilização do sêmen de epidídimo tem sido estudada em diversas espécies, sendo um importante modelo experimental para o estudo do sêmen ejaculado. Além disso, esta técnica pode ser importante no caso de óbito de animais de alto valor genético. Mais especificamente no bovino, poucos são os estudos em relação à melhor forma de armazenamento, resistência a criopreservação, características funcionais e o status oxidativo.

Assim, é de extrema importância o estudo da utilização do sêmen do epidídimo de bovinos, não só em relação ao processo de armazenamento e criopreservação, mas como modelo para o estudo de diluidores visando a melhora da qualidade pós-descongelação.

Uma alternativa para a melhora da qualidade do sêmen após a criopreservação seria o tratamento com ácidos graxos poli-insaturados, mais especificamente o ácido decosaexanóico, importante ácido graxo poli-insaturado da membrana espermática (AITKEN et al., 2006), que permite uma maior fluidez de membrana e uma maior resistência ao estresse oxidativo. No entanto, a maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados poderia aumentar a susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo. Uma alternativa para evitar este efeito negativo seria o tratamento do diluidor utilizado para a criopreservação com antioxidantes tanto enzimáticos como não enzimáticos. Isto, por sua vez, deve ser realizado

utilizando diferentes concentrações e diferentes combinações. Sabe-se que a produção de ROS por espermatozóides é um processo fisiológico normal, sendo importante diversos mecanismos importantes para a funcionalidade da células espermática (AITKEN et al., 1991). Assim, a presença de níveis moderados de ROS é necessária, o que requer que o tratamento antioxidante seja realizado criteriosamente.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão abordará apenas o essencial para o entendimento da problemática atual. Na discussão dos resultados os temas serão analisados em mais detalhes.

2.1 *Sêmen de epidídimo*

A utilização de amostras espermáticas oriundas do epidídimo para seu emprego em biotécnicas reprodutivas tem sido estudada em diversas espécies tais como: canina (YU; LEIBO, 2002), cervídea (HISHINUMA et al., 2003), suína (IKEDA et al., 2002), ovina (KAABI et al., 2003) e bovina (FOOTE, 2000). A obtenção de espermatozóides epididimários é uma técnica que pode ser de suma importância ao maximizar a capacidade reprodutiva de machos de diversas espécies, especialmente daqueles com alto valor genético, uma vez que permite a coleta, mesmo após a morte do animal (NICHI et al., 2007a). Além disso, o sêmen coletado do epidídimo possui características semelhantes às do sêmen ejaculado, o que pode ser comprovado pela produção *in vitro* de embriões (NICHI et al., 2007a), assim como pelo nascimento de animais saudáveis utilizando sêmen epididimário criopreservado (ARAÚJO, 2008). Isto indica que o sêmen coletado desta maneira pode ser utilizado como modelo experimental para o sêmen ejaculado, com a vantagem da facilidade de obtenção em peças de matadouro; poder minimizar a utilização de animais para a coleta de sêmen, entre outras. Além disto, trabalho recente indica que o genoma do bovino possui mais semelhanças com o humano que o de roedores (ELSIK et al., 2009), modelo animal bastante utilizado para o estudo em humanos. Assim, o sêmen do epidídimo pode ser empregado como modelo para o estudo de diversas técnicas em humanos, como por exemplo, a microcirurgia para aspiração de espermatozóides epididimários (MESA), técnica bastante utilizada em casos de azoospermia obstrutiva (WALD et al., 2006). Também, o estudo do sêmen do epidídimo pode auxiliar no estudo da fisiologia espermática, principalmente no que se refere ao processo de maturação.

Alguns pontos são importantes para viabilizar a utilização desta tecnologia para a aplicação em biotecnologias reprodutivas, como as condições de armazenamento do testículo,

particularmente a temperatura (KAABI et al., 2003). Existe um consenso de que as temperaturas entre 0 e 5ºC são apropriadas para o armazenamento do testículo entre a morte do animal e a coleta e processamento do sêmen (KIKUCHI et al., 1998; KISHIKAWA et al., 1999; KAABI et al., 2003). Isto ocorre apesar da susceptibilidade do sêmen de epidídimo ao choque frio (WHITE, 1993). Kaabi et al. (1993) concluíram que amostras espermáticas provenientes de epidídimos de carneiros mantidos a 5ºC mostraram maior capacidade fecundante quando comparadas às de epidídimos armazenados em temperatura ambiente. No entanto, nenhum destes experimentos elucidou a razão para tais achados.

2.2 *Estresse oxidativo no sêmen*

Um dos motivos da importância da temperatura seria o ataque das espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species - ROS), que provocam o estresse oxidativo. Este tipo de estresse causa danos estruturais a biomoléculas, DNA, lipídeos, carboidratos e proteínas, assim como outros componentes celulares (HALLIWELL, 1991). Trabalhos anteriores verificaram que o espermatozóide é particularmente susceptível ao ataque das ROS (JONES; MANN, 1977). Tal fato deve-se à pequena quantidade de citoplasma na célula espermática normal, o que limita a quantidade de antioxidantes, principalmente os enzimáticos (VERNET et al., 2004). Além disto, a grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (polyunsaturated fatty acids - PUFA) na membrana espermática, que permite a fluidez necessária para os eventos associados à fertilização (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985; LENZI et al., 2000; AGARWAL et al., 2003), torna os espermatozóides ainda mais vulneráveis. Os ácidos graxos são formados por cadeias de átomos de carbono ligados a hidrogênio com um grupo carboxila terminal (COOH). A presença de ligações duplas entre carbonos, também chamada insaturação, torna o ácido graxo mais maleável. No entanto, as ROS oxidam preferencialmente as ligações carbono-hidrogênio no grupo metileno (CH_2) adjacente à ligação dupla. Após iniciado, o processo se torna autocatalítico, levando à formação de hidroperóxidos e produtos secundário, que intensificarão o processo oxidativo (DIX; AIKENS, 1993).

2.3 *Antioxidantes*

Freqüentemente define-se um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, quando comparadas com as de um substrato oxidável, retarda ou previne significantemente a oxidação deste substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

O plasma seminal possui um mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo que compensa a deficiência de enzimas citoplasmáticas no espermatozóide (DONELLY et al., 1999), através de uma série de antioxidantes enzimáticos tais como superóxido dismutase (SOD; ALVAREZ et al., 1987), sistema glutationa peroxidase / glutationa redutase (GPx/GRD; CHAUDIERE et al., 1984) e catalase (JEULIN et al., 1989). Além destes, existem, no plasma seminal, antioxidantes não enzimáticos, tais como, ascorbato (FRAGA et al., 1991), urato (THIELE et al., 1995), α-tocoferol (Vitamina E; AITKEN; CLARKSON, 1988), piruvato (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992), glutationa (LENZI et al., 1994), taurina e hipotaurina (ALVAREZ; STOREY, 1983).

Os mecanismos de defesa antioxidante, segundo Saleh e Agarwal (2002), exercem proteção através da prevenção, da interceptação e do reparo das reações de oxidação.

A prevenção da formação de ROS é a primeira linha de defesa contra a oxidação. Este nível de proteção tem como principal meio de controle a quelação de metais de transição que, por sua vez, ao se soltarem dos produtos da redução do oxigênio, produzem oxidantes secundários ainda mais reativos, como por exemplo o radical hidroxila (HALLIWELL, 1990).

A interceptação das ROS se baseia na quebra da reação em cadeia que ocorre com os radicais livres para a formação de produtos oxidantes. Esta quebra promovida por certos antioxidantes, como por exemplo o α-tocoferol, deve resultar em produtos finais não radicais, isto é, sem elétrons despareados (SIES, 1993).

O reparo dos danos provocados por agentes oxidantes pode ocorrer em alguns casos. Porém, nos espermatozóides, este reparo se torna impossível devido à falta de sistemas de enzimas citoplasmáticas necessárias à esta função. Esta característica, aliada a grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana, fazem do espermatozóide uma célula ímpar por sua susceptibilidade à oxidação lipídica (ALVAREZ et al., 1987; AITKEN et al., 1989).

A suplementação oral de machos com antioxidantes para a proteção do espermatozóide ainda é especulativa, e depende tanto da exposição do espermatozóide a um estresse oxidativo suficiente para sobrepujar os mecanismos de defesa, como do aumento dos níveis de antioxidante nos tratos reprodutivos e no espermatozóide em si, que a suplementação oral possa causar (TAYLOR, 2001).

Em humanos, a maioria dos experimentos relacionados ao tratamento para evitar ou diminuir o estresse oxidativo espermático, leva em conta a proteção *in vitro* de amostras já coletadas visando a aplicação de biotécnicas tais como, fecundação *in vitro* e injeção intra-citoplasmática (AITKEN et al., 1993; GRIVEAU; LE LANNOU, 1994; GRIVEAU et al., 1995; TWIGG et al., 1998; ARMSTRONG et al., 1999; CALAMERA et al., 2001).

Em animais, o tratamento de amostras espermáticas com antioxidantes, como α-tocoferol, ácido ascórbico (vitamina C) e algumas enzimas antioxidantes, também tem sido estudado com resultados diversos. O α-tocoferol atua na membrana plasmática, como um antioxidante lipo-solúvel, prevenindo a reação oxidativa em cadeia (MATÈS, 2000). O ácido ascórbico atua na proteção do citocromo P-450 contra a destruição por pseudo-substratos oxidativos e oxigênio (FRAGA et al., 1991). Por sua vez, os antioxidantes enzimáticos atuam em cascata, sendo que a superóxido dismutase provoca a dismutase do ânion superóxido (O_2^-), provocando a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este, por sua vez, pode ser destruído pela catalase ou pela glutationa peroxidase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989), evitando a formação do radical hidroxila (OH-), a ROS mais prejudicial ao espermatozóide (HALLIWELL, 1991).

Um fator importante e a possível causa para os diferentes resultados (positivos e negativos) em relação aos tratamentos de amostras com antioxidantes é a quantidade de antioxidante utilizada em cada experimento. Isto ocorre, pois a produção de ROS por espermatozóides é um processo fisiológico normal, sendo importante para a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência da reação acrossômica e para a fusão espermatozóide / oócito (AITKEN et al., 1991; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; GRIVEAU et al., 1994; KODAMA et al., 1996; DE LAMIRANDE et al., 1997; SENGOKU et al., 1998). O mecanismo de ação das ROS na fisiologia normal do espermatozóide ainda não foi completamente elucidado porém, resultados dos experimentos convergem para a definição de que os processos de hiperativação, capacitação, ligação com a zona pelúcida e reação acrossômica sejam processos oxidativos ou regulados por redução. Sendo assim, uma quantidade excessiva de antioxidantes poderia influenciar negativamente a fertilidade *in vitro*

de amostras espermáticas tratadas com antioxidantes. Por outro lado, uma quantidade ideal poderia incrementar significantemente a qualidade espermática, evitando os danos causados pelas ROS.

2.4 *Ácidos graxos poli-insaturados*

Os estudos da relação entre os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) e as células espermáticas consideram muito a composição da dieta do indivíduo. Dietas ricas em óleo de linhaça e óleo de peixe foram estudadas em diversas espécies e em diferentes processos fisiológicos, com resultados igualmente diversos tais como diminuição na pressão sanguínea em ratos hipertensivos (FRENOUX et al., 2001), diminuição da eclodibilidade de ovos em frangos (PAPPAS et al., 2006), ação benéfica, porém moderada no tratamento da arterioesclerose em humanos (VON SCHACKY et al., 1999) e inibição da carcinogênese mamária em ratos (MAILLARD et al., 2006). Em bovinos, particularmente, devido à degradação ruminal, a maioria dos triglicérides e ácidos graxos são hidrogenados em sua passagem pelo rúmen, o que impede sua absorção e conseqüente eficiência desta suplementação.

Na célula espermática, os PUFAs são especialmente importantes devido a sua alta concentração na membrana plasmática, o que torna os espermatozóides altamente susceptíveis ao ataque das ROS, devido à presença das ligações duplas (insaturações) entre carbonos (carbono metilênico bis-alílico), mais facilmente oxidados. A função dos PUFAs na constituição da membrana espermática e nos processos fisiológicos que levam à fecundação foi confirmada em diversos estudos em diferentes espécies (LEATH et al., 1983, LANGLAIS; ROBERTS, 1985; LADHA, 1998). Além disto, estudos indicam que a composição lipídica da membrana espermática de diversas espécies também influencia a resistência ao choque frio (refrigeração e criopreservação; PARKS; LYNCH, 1992). Resultados anteriores indicam que o ácido decosa-hexanóico (DHA) é o PUFA mais importante para o espermatozóide, atuando na fluidez da membrana espermática e na regulação da espermatogênese (OLLERO et al., 2000). No entanto, grandes quantidades deste ácido graxo na membrana espermática, torna o espermatozóide mais susceptível ao ataque das ROS.

Poucos são os estudos que relacionam o tratamento com PUFAs a um possível efeito em relação à susceptibilidade ao ataque das ROS, sendo que a grande maioria se concentra na suplementação oral com óleo de peixe ou de linhaça. Pelo conhecimento destes autores, não há descrição de tal correlação para o tratamento de amostras espermáticas em touros. Visto ter sido comprovado que a maior susceptibilidade da célula espermática ao ataque das ROS se deve, em grande parte, à alta quantidade de PUFAs em suas membranas, pode-se inferir que um tratamento que alterasse o perfil lipídico seminal ou espermático poderia causar enorme impacto para estes animais. Caso os PUFAs fossem incorporados à membrana espermática, isto os tornaria ainda mais susceptíveis ao ataque das ROS, o que talvez pudesse ser evitado pelo tratamento com antioxidantes. Por outro lado, se os PUFAs não fossem incorporados, permanecendo no meio extracelular, haveria uma maior quantidade de substrato para o ataque das ROS, o que provavelmente pouparia as células espermáticas.

Outro aspecto dos PUFAs em touros seria no caso de touros de centrais de inseminação. Neste caso, uma maior quantidade de PUFAs na membrana espermática poderia causar um impacto positivo na melhora da congelabilidade de amostras espermáticas.

Hipótese

3 HIPÓTESE

1- A temperatura de armazenamento do epidídimo influencia os espermatozóides epididimários, comprometendo a fertilidade *in vitro* e a criopreservação.

2- A adição de antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados ao meio diluidor melhora a criopreservação e a capacidade fecundante do sêmen epididimário.

Objetivo

4 OBJETIVOS

Os objetivos do presente experimento são:

- Verificar a melhor temperatura (4 ou 34ºC) para a estocagem dos testículos para a coleta do sêmen da cauda do epidídimo de touros, quanto a resistência das células espermáticas ao estresse oxidativo, morfologia espermática e capacidade fecundante *in vitro* (Experimento 1);
- Avaliar a motilidade e a integridade da membrana plasmática e o potencial mitocondrial de espermatozóides epididimários criopreservados de testículos armazenados a 4 ou 34ºC (Experimento 2).
- Avaliar os efeitos da temperatura de armazenamento dos epidídimos e da criopreservação das amostras espermáticas coletadas sobre a fertilidade *in vitro* e a resistência ao estresse oxidativo (Experimento 3).
- Avaliar se o tratamento com ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) diretamente em amostras espermáticas coletadas da cauda do epidídimo de touros é capaz de fornecer maior substrato para o ataque das espécies reativas de oxigênio, protegendo o espermatozóide ou se os mesmos são incorporados à membrana espermática tornando-os mais susceptíveis a esse ataque. Neste ultimo caso, verificar se o tratamento com antioxidantes é capaz de evitar este efeito (Experimento 4).
- Avaliar se o tratamento com PUFAs diretamente em amostras espermáticas coletadas da cauda do epidídimo de touros pode aumentar a congelabilidade da célula espermática, e se o tratamento com antioxidantes enzimáticos ou não, podem melhorar a qualidade desta célula, teoricamente menos resistente ao ataque da ROS (Experimento 4).
- Avaliar, se o tratamento com antioxidante enzimático ou não (qual e em que quantidade) é capaz de evitar os efeitos negativos da criopreservação em amostras espermáticas coletadas de epidídimos (Experimento 4).

Material e Método

5 MATERIAL E MÉTODO

Esta seção foi dividida em 4 experimentos e a respectiva descrição da metodologia utilizada em cada um.

5.1 *Experimento 1*

O presente experimento teve como objetivo avaliar qual a temperatura mais adequada (4 ou 34ºC) para a estocagem dos testículos para a coleta do sêmen da cauda do epidídimo de touros, e se esta temperatura influencia na resistência das células espermáticas ao estresse oxidativo e na capacidade fecundante *in vitro* das mesmas.

Todos os reagentes utilizados foram da marca Sigma–Aldrich (Bornem, Bélgica), sendo as exceções informadas apropriadamente.

5.1.1 Epidídimos

Foram utilizados testículos de 24 touros jovens (em torno de 2 anos de idade), de origem *Bos taurus taurus* (Belgian Blue, Limousin e Charolês), abatidos em matadouro próximo ao laboratório de Fisiologia Veterinária do Departamento de Ciências Veterinárias da Faculdade de Ciências Biomédicas, Farmacêuticas e Veterinárias da Universidade da Antuépia, onde foi realizado o experimento.

5.1.2 Amostras espermáticas de epidídimo

Logo após o abate o conjunto testículo/epididídimo foi armazenado em recipientes térmicos contendo água gelada (Grupo 4ºC) ou água morna (Grupo 34ºC). Para tornar os grupos mais homogêneos, os dois testículos de cada animal foram separados sendo um armazenado a 0ºC e o outro a 34ºC. Não menos que duas e não mais que cinco horas após, as amostras espermáticas de epidídimo foram coletadas por pequenas incisões (<1mm) na cauda do epidídimo utilizando-se um bisturi, sendo a amostra aspirada com auxílio de pipeta automática. Tal procedimento foi realizado após pressionar-se a base da cauda do epidídimo com uma pinça homostática, o que aumentava a pressão interna permitindo que a amostra epididimária fluísse mais facilmente pela incisão. A fim de evitar contaminação com sangue, as incisões foram realizadas criteriosamente, na tentativa de evitar a dissecção desnecessária de vasos ou tecidos.

5.1.3 Processamento do sêmen

Após a ressuspensão da amostra coletada em solução fisiológica salina (0,9% NaCl), uma alíquota da amostra foi fixada em solução de formol tamponada e isotônica (1:100) para subseqüente análise da concentração espermática utilizando-se uma câmara de Burke. A mesma solução foi utilizada para a determinação da morfologia espermática, levando-se em conta apenas as gotas citoplasmáticas (porcentagem de gotas citoplasmáticas distais, proximais e totais). Tal procedimento foi adotado, pois estudos anteriores indicam que, em sêmen ejaculado, este defeito espermático apresenta alta correlação com o estresse oxidativo (ENGEL et al., 1999; SAID et al., 2005a). Ademais, sabe-se que, no epidídimo, a porcentagem de células apresentando essa alteração morfológica é alta e fisiológica (AMANN; ALMQUIST, 1962; BRITZ et al., 2005; GOOVAERTS et al., 2006). As amostras espermáticas foram avaliadas em câmara úmida por microscopia de luz sob imersão (1000x).

5.1.4 Fecundação *in vitro*

A capacidade fecundante da amostra foi avaliada através de um protocolo de fecundação *in vitro* (FIV) utilizado na rotina no laboratório de FIV do Departamento de Fisiologia Animal da Universidade da Antuérpia (Bélgica). Ovários foram coletados em abatedouros nas proximidades do laboratório e armazenados em solução fisiológica aquecida (37ºC) até o processamento. No laboratório, folículos com diâmetros entre 2 e 6 mm foram puncionados e os complexos cumulus oócitos (CCO) foram recuperados e morfologicamente selecionados baseando-se na homogeneidade do citoplasma e na quantidade e compactação das células do cumulus. Os CCOs foram então lavados em meio HEPES-TALP (Anexo A) e, posteriormente, cultivados em placas de 4 poços (100 oócitos/poço) por 24 h em 500 µL de meio de maturação (Anexo B) a 38.5 °C em incubadora úmida a 5% CO_2 em ar.

Uma alíquota de 500 µL de cada amostra espermática coletada de epidídimo foi centrifugada em gradiente de Percoll a 300 G por 20 minutos (Anexo C, Pharmacia, Uppsala, Sweden). Cinqüenta oócitos foram fecundados com cada amostra espermática na concentração final de 10^6 espermatozóide por mL em 500 µL de meio de fecundação (Anexo D), a 38.5° C em incubadora úmida a 5% CO_2 em ar.

Após 20 horas, os presumíveis zigotos foram submetidos à agitação mecânica (*vortex)* em 2,5 mL de HEPES-TALP para a remoção das células do cumulus, sendo então distribuídos em gotas de 50 µL de fluído sintético de oviduto (SOF) suplementado com de 5% FCS, sob óleo mineral testado para embriões. Após 7 dias de incubação em 90% de N_2, 5% de O_2 e 5% de CO_2 a 38.5° C, a taxa de blastocistos foi avaliada.

5.1.5 Resistência do espermatozóide ao estresse oxidativo

Após a coleta e a determinação da concentração espermática, o semen do epidídimo foi centrifugado (800 × g, 10 min) com a finalidade de remover os resquícios de fluido epididimário. Os espermatozóides foram então ressuspensos até uma concentração final de 1 × 10^6 espermatozóides/mL.

A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de sulfato de ferro (250 µL, 4 mM) e ascorbato de sódio (250 µL, 20 mM) a 1 mL da suspensão espermática. Na seqüência, a mistura foi incubada por 2 horas a 37°C (GOMEZ et al., 1998). O produto da peroxidação lipídica mais facilmente mensurado por este método é o malondialdeídeo (MDA). A mensuração de MDA foi realizado pelo protocolo descrito por Ohkawa et al. (1979). O método se baseia na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de MDA, reação esta que ocorre em altas temperaturas e baixo pH, e que resulta na formação de um cromógeno rosa que pode ser quantificado com espectrofotômetro.

Após o período de 2 horas, 500 µL da mistura de incubação e 1000 µL de uma solução a 10% (v:v) de ácido tricloroacético gelado (TCA 10%) foram homogeneizados e centrifugados (18,000 × g, 15 min, 15 °C), para a precipitação de substâncias que poderiam interferir na leitura. Uma alíquota do sobrenadante foi recuperado (500 µL) e misturado com 500 µL de 1% (v:v) de ácido tiobarbitúrico (TBA 1%, diluído em 0,05 N de NaOH) em um tubo de vidro e incubado em água fervente (90 a 100 °C) por 20 min. Após este período, os tubos contendo a mistura foram imediatamente resfriados em banho de gelo (0 °C) para parar a reação. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram então quantificadas utilizando-se um espectrofotômetro (U-2001 spectrophotometer, Hitachi High Technologies America, Inc., San Jose, CA, US) em comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram comparados a uma curva padrão previamente preparada com uma solução padrão de MDA. A concentração de TBARS foi determinada utilizando um valor de 1.56×10^5 M/mL com o coeficiente de extinção molar do MDA (BUEGE; AUST, 1978). O índice de peroxidação lipídica foi descrito em nanogramas de TBARS em 10^8 espermatozóides.

5.1.6 Análise Estatística

Os dados foram avaliados através do software SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). O efeito da temperatura de estocagem (4 ou 34 °C) foi determinada por testes paramétricos (General Linear Model procedure–PROC GLM) e não paramétricos (Wilcoxon), de acordo com a normalidade dos resíduos (Distribuição de Gauss) e a homogeneidade das variâncias para cada variável separadamente. A porcentagem de espermatozóides apresentando gota proximal e os níveis de TBARS e a porcentagem de

espermatozóides apresentando gota distal foram transformados para o logarítimo de seus valores na base 10 e para raiz quadrada, respectivamente. Estas variáveis foram analisadas através pelo teste t de Student. A porcentagem de blastocitos iniciais, normais, expandidos e eclodidos não apresentaram distribuição normal, sendo então analisados pelo teste de Wilcoxon. Um valor de probabilidade menor que 5% (α=0,05) foi considerado significante. Correlações de Pearson e Spearman foram utilizados para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente. Resultados foram descritos pela média original (não transformada) e pelo erro padrão da média de cada variável.

5.2 *Experimento 2*

O presente experimento teve como objetivo avaliar a temperatura mais adequada (4 ou 34ºC) para o armazenamento dos testículos para a coleta de sêmen da cauda do epidídimo de touros, para a posterior criopreservação das células espermáticas

Os reagentes utilizados eram da marca Sigma–Aldrich (Bornem, Bélgica), sendo as exceções informadas apropriadamente.

5.2.1 Epidídimos

Testículos de 18 touros europeus adultos (*Bos taurus taurus*; 1-5 anos de idade), de diferentes raças (Belgian Blue, Limousin, Charolês), coletados em abatedouro, foram utilizados no presente experimento. Os testículos direito e esquerdo de cada touro foi separado e armazenado a 4 ou 34ºC (água com gelo e água morna em isopores, respectivamente). Isto foi feito apenas para tornar os grupos o mais homogêneos possível; os testículos não foram tratados como pares. Com a finalidade de avaliar adequadamente o efeito das temperaturas e ao mesmo tempo minimizar os efeitos *post mortem*, a coleta de sêmen foi realizada em um mínimo de 2 horas e em um máximo de 4 horas após o abate.

5.2.2 Coleta do sêmen

Amostras espermáticas epididimárias foram coletadas como descrito anteriormente (Experimento 1). As amostras foram ressuspensas em 1 mL de solução fisiológica salina (NaCl 0,9%), e alíquotas da amostra foram submetidas à análise de motilidade (Computer Assisted Sperm Aanalysis - CASA; Hamilton-Thorne Ceros 12.1, Orange Medical, Brussels, Belgium), à avaliação da concentração espermática (Câmara de contagem de Bürker), e à uma coloração tripla para integridade de membrana (SYBR-PI; GARNER; JOHNSON, 1995; Molecular Probes, Leiden, Holanda) e potencial mitocondrial (JC-1; GARNER; THOMAS, 1999; Molecular Probes, Leiden, Holanda). As amostras espermáticas foram criopreservadas, sendo que, após a descongelação, a avaliação computadorizada da motilidade e a coloração tripla foram novamente realizadas.

5.2.3 Análise computadorizada da motilidade (CASA)

O analisador de sêmen computadorizado Hamilton Thorne (CASA; HTR Ceros 12.1.) foi utilizado para a avaliação das características de motilidade do sêmen logo após a coleta. Sete µL de cada amostra espermática foram inseridos em uma câmara de contagem Leja (Orange Medical, Bruxelas, Bélgica) previamente aquecidos a 37°C. Cinco campos foram selecionados aleatoriamente, sendo avaliados 5 vezes cada um. A média dos cinco campos avaliados foi armazenada para posterior análise. O instrumento estava calibrado com as seguintes configurações: 30 molduras a uma taxa de 60 molduras/segundo, contraste mínimo de 20, tamanho mínimo de célula de 5 e células progressivas correspondendo a uma velocidade média de percurso (VAP) maior que 50 µm/s e retilinearidade maior que 70%. Espermatozóides com VAP maior que 30 µm/s foram considerados móveis. As seguintes variáveis foram avaliadas: VAP (µm/s; Figura 1), VSL (µm/s; Figura 1), VCL (µm/s; Figura 1), ALH (µm), BCF (Hz), STR (%), LIN (%); MOT (%), PROG (%) (Quadro 1). Adicionalmente, os espermatozóides foram divididos em 4 grupos baseando-se na velocidade de movimento, que consistiu de: Rápidos (RAP; VAP > 50 µm/s; %), Médios (MED, 30 µm/s < VAP < 50 µm/s; %) e Lentos (SLOW; VAP < 30 µm/s ou VSL < 15 µm/s; %) e espermatozóides imóveis (STATIC; %).

VSL: Velocidade retilínea (µm/s)

VAP: Velocidade média de percurso (µm/s)

VCL: Velocidade curvilínea (µm/s)

Figura 1 - Movimento esquemático do espermatozóide avaliado pelo CASA

	Terminologia	Significado
VAP	Velocidade média de percurso (µm/s)	Velocidade média do espermatozóide considerando-se um caminho suavizado.
VSL	Velocidade retilínea (µm/s)	Distância mínima que o espermatozóide percorre durante o tempo entre duas avaliações (*scans*).
VCL	Velocidade curvilínea (µm/s)	Média da velocidade espermática medida através do percurso real percorrido.
ALH	Amplitude do movimento lateral da cabeça (µm)	Comprimento médio da oscilação da cabeça do espermatozóide
BCF	Frequência de batimento cruzado (Hz)	Frequência do movimento lateral, que faz com que a cabeça do espermatozóide cruze o percurso em ambas as direções.
STR	Retilinearidade (VSL/VAP, %)	Qualidade do movimento retilíneo suavizado percorrido.
LIN	Linearidade (VSL/VCL, %)	Qualidade do movimento retilíneo real percorrido.
MOT	- Motilidade (%)	Porcentagem de células móveis.
PROG	- Motilidade progressiva (%)	Porcentagem de células com motilidade progressiva.

Quadro 1 – Abreviações e significados das variáveis analisadas pelo CASA (adaptado de Goovaerts et al., 2006)

5.2.4 Análise da integridade da membrana e do potencial mitocondrial espermáticos

Uma alíquota do sêmen fresco foi avaliada quanto à integridade da membrana e a atividade mitocondrial em uma mesma preparação, utilizando-se a associação das sondas SYBR14/PI e a JC1, respectivamente. As probes SYBR®-14 e iodeto de propídio (PI) são corantes de núcleo e foram utilizadas para a avaliação de integridade da membrana espermática (LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit, Molecular Probes, Leiden, Holanda). Uma solução de trabalho de 1 mM de SYBR-14 em 100% de dimetil sulfóxido anidro (DMSO) foi primeiramente diluída na proporção de 1:50 em meio tampão Hepes. O iodeto de propídeo foi dissolvido em água até uma concentração de 2,99 mM. Para a avaliação do potencial de membrana mitcondrial em conjunto com a avaliação da integridade de membrana, 2 µl de uma solução 1,53 mM de JC-1 (Molecular Probes, Leiden, Holanda) em DMSO foi adicionada a 1 ml da amostra diluída em combinação com 0,7 µl de SYBR-14 e 12 µl da solução de PI (GARNER; JOHNSON, 1995; GARNER; THOMAS, 1999). A análise das amostras espermáticas foi realizada por microscopia de fluorescência. Para isto, foi utilizado um microscópio Leica DMR (Van Hopplynus N.V., Bruxelas, Bélgica) equipado com filtro de excitação de 450–490 nm e lâmpada de mercúrio de 100 W, sendo as amostra avaliadas em aumento de 1000×.

O DNA de espermatozóides com membrana intacta foi corado pelo SYBR®-14, resultando em uma cor verde brilhante fluorescente quando excitado a 488 nm. O iodeto de propídeo corou o núcleo de espermatozóides com membrana lesada emitindo coloração vermelha (excitação: 530 nm). A combinação das duas fluorescências permitiu a distinção entre espermatozóides com membrana intacta e membrana lesada em uma mesma preparação. A probe JC-1, por sua vez, cora diferentemente espermatozóides com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial. Em células com alto potencial de membrana (-80 a -100 mA) a peça intermediária emite fluorescência vermelha; já células com baixo potencial de membrana emitem fluorescência verde.

Assim, espermatozóides corados com a associação JC-1 e SYBR-14/PI exibem 3 tipos de espermatozóides fluorescentes (DE PAUW et al., 2003):

- Cabeça vermelha e peça intermediária verde: indica membrana lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial (DM/LMP: *damaged membrane / low mitocondrial potential*).

- Cabeça verde e peça intermediária alaranjada: indica membrana intacta e alto potencial de membrana mitocondrial (IM/HMP: *intact membrane / high mitocondrial potential*).
- Cabeça verde e peça intermediária verde: membrana intacta e baixo potencial de membrana mitocondrial (IM/LMP: *intact membrane / low mitocondrial potential*).

É importante notar que não foram observados espermatozóides com membrana lesada e alto potencial de membrana mitocondrial.

5.2.5 Processamento e criopreservação do sêmen

Imediatamente após a coleta, cada amostra espermática foi diluída para uma concentração final de 200 x 10^6/mL em meio diluente Triladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) com 20% de gema de ovo clarificada, e resfriada por 3h a 4°C. Na sequência, as amostras espermáticas foram armazenadas em palhetas de 0,5 mL e criopreservadas utilizando-se uma máquina computadorizada (Ice Cube; Sy-Lab, Purkersdorf, Àustria) em uma velocidade de congelação otimizada (10°C/min de 4°C para -4°C; 40°C/min de -4°C para -150°C). Após este período, as amostras foram submersas em nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas e botijão de nitrogênio até a descongelação. Após 1 semana da criopreservação, o sêmen foi descongelado (mínimo de 30 segundos em banho-maria a 37ºC) e as amostras submetidas à análise computadorizada da motilidade e à avaliação concomitante da integridade da membrana e da atividade mitocondrial, como descrito anteriormente.

5.2.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa do SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). Os efeitos da temperatura de armazenamento dos epididídimos (4 versus 34ºC), do processo de criopreservação (pré versus pós), assim como da interação entra estes fatores foram determinados pelo PROC GLM. Para as variáveis relacionadas ao CASA a média dos 5 campos foi considerada para a análise estatística. Diferenças entre os tratamentos foram avaliadas por métodos paramétricos (teste t de Student para cada fator separadamente

ou teste LSD para a combinação dos fatores) e não paramétricos (Wilcoxon), de acordo com a normalidade dos resíduos (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias. A porcentagem de espermatozóides com membrana lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial (DM/LMP), e a porcentagem de espermatozóides estáticos (STATIC) foram transformados para a raiz quadrada e para logaritmo na base 10, respectivamente. O restante das variáveis não apresentou distribuição normal sendo que, como não houve transformações eficientes, estas variáveis foram analisadas por testes não paramétricos. Um valor de probabilidade de $p < 0,05$ foi considerado significante. Os resultados foram descritos através de suas médias não transformadas ± os erros padrões das médias (EPM). As correlações de Pearson e Spearman foram utlizadas para calcular a relação entre as variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente, para cada um dos grupos separadamente (4ºC pré; 34ºC pré; 4°C pós; 34ºC pós).

5.3 *Experimento 3*

O objetivo do presente estudo foi avaliar se espermatozóides epididimários estocados em diferentes temperaturas e depois criopreservados possuíam diferenças quanto a fertilidade *in vitro* e a resistência ao estresse oxidativo.

Os reagentes utilizados eram da marca Sigma–Aldrich (Bornem, Bélgica), sendo as exceções informadas apropriadamente.

5.3.1 Epidídimos

Testículos de 18 touros europeus adultos (*Bos taurus taurus*; 1-5 anos de idade), de diferentes raças (Belgian Blue, Limousin, Charolês), coletados em abatedouro, foram utilizados no presente experimento. Os testículos direito e esquerdo de cada touro foram separados e armazenado a 4 ou 34ºC (água com gelo e água morna em caixas térmicas, respectivamente). Isto foi feito apenas para tornar os grupos o mais homogêneos possível; os testículos não foram tratados como pares. Com a finalidade de avaliar adequadamente o efeito

das temperaturas e ao mesmo tempo minimizar os efeitos *post mortem*, a coleta de sêmen foi realizada em um mínimo de 2 horas e em um máximo de 4 horas após o abate.

5.3.2 Coleta do sêmen

Amostras espermáticas epididimáticas foram coletadas como descrito anteriormente (Experimento 1). As amostras foram ressuspensas em 1 mL de solução fisiológica salina e criopreservadas.

5.3.3 Processamento e criopreservação do sêmen

O processamento e a criopreservação ocorreu como descrito no item 5.1.3 do experimento 1.

5.3.4 Fecundação *in vitro*

O procedimento de fecundação *in vitro* foi realizado como descrito anteriormente na seção 5.1.4 do experimento 1.

5.3.5 Resistência do espermatozóide ao estresse oxidativo

A mensuração da resistência do espermatozóide ao estresse oxidativo realizado como descrito anteriormente na seção 5.1.5 do experimento 1.

5.3.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa do SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). O efeito da temperatura de armazenamento dos epididídimos (4 versus 34ºC) no sêmen criopreservado foi determinados pelo PROC GLM. Diferenças entre os tratamentos foram avaliadas por métodos paramétricos (teste t de Student para cada fator separadamente) e não paramétricos (Wilcoxon), de acordo com a normalidade dos resíduos (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias. A porcentagem de total de blastócitos foi transformado para logaritmo na base 10. Os níveis de TBARS obedeceram às premissas não sendo necessária qualquer transformação. Estas variáveis foram analisadas através pelo teste t de Student. A porcentagem de blastocitos iniciais, normais, expandidos e eclodidos não apresentaram distribuição normal, sendo então analisados pelo teste de Wilcoxon. Um valor de probabilidade de $p < 0,05$ foi considerado significante. Os resultados foram descritos através de suas médias não transformadas ± os erros padrões das médias (EPM). As correlações de Pearson e Spearman foram utlizadas para calcular a relação entre as variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente, para cada um dos grupos separadamente (4 e 34ºC). Para as correlações, os resultados da avaliação computadorizada da motilidade espermática (avaliada pelo CASA) e da coloração tripla (SYBR, IP, JC1) das amostras pós-descongelação (Experimento 2) foram consideradas.

5.4 *Experimento 4*

Este experimento teve como objetivos:

- Avaliar se o tratamento com ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) diretamente em amostras espermáticas coletadas da cauda do epidídimo de touros foi capaz de fornecer maior substrato para o ataque das espécies reativas de oxigênio, protegendo o espermatozóide ou se os mesmos seriam incorporados à membrana espermática tornando-os mais susceptíveis a esse ataque. Neste ultimo caso, verificar se o tratamento com antioxidantes seria capaz de evitar este efeito.

- Avaliar se o tratamento com ácido decosaexanóico (DHA) diretamente em amostras espermáticas coletadas da cauda do epidídimo de touros pode aumentar a congelabilidade da célula espermática, e se o tratamento com antioxidantes, enzimáticos ou não, poderia melhorar a qualidade desta célula, teoricamente menos resistente ao ataque da ROS.
- Avaliar, se o tratamento antioxidante enzimático ou não (qual e em que quantidade) é capaz de evitar os efeitos negativos da criopreservação em amostras espermáticas coletadas de epidídimos.

Os reagentes utilizados eram da marca Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, EUA), sendo as exceções informadas apropriadamente.

5.4.1 Epidídimos

Testículos de cerca de 25 touros sem raças definidas foram coletados em abatedouro próximo ao laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica Minas, campus de Poços de Caldas, onde foi realizado o procedimento de coleta de sêmen e criopreservação das amostras.

5.4.2 Coleta do sêmen

Amostras espermáticas epididimárias foram coletadas como descrito anteriormente (Experimento 1). As amostras foram ressuspensas em 1 mL de solução fisiológica salina e criopreservadas em diluidores submetidos a diferentes tratamentos.

5.4.3 Tratamentos

Os tratamentos antioxidantes foram adicionados ao diluidor comercial Bovimix® (Nutricell, Campinas, Brasil) para a criopreservação do sêmen.

O experimento foi dividido em 3 fases:

1- Antioxidantes enzimáticos: Nesta primeira fase, o objetivo foi verificar a quantidade ideal de cada antioxidante separadamente, baseando-se nos níveis normais encontrados no sêmen de touros (NICHI et al., 2006) e/ou em trabalhos anteriores em que o sêmen foi tratado com antioxidantes. Para cada antioxidante foram utilizadas amostras de oito testículos, sendo cada amostra dividida em 5 alíquotas submetidas ao tratamento com antioxidantes enzimáticos e combinações (Quadro 3) entre os mesmos. Para evitar o efeito de diferenças entre testículos, todos os tratamentos foram empregados em cada amostra. Caso o sêmen não fosse suficiente, a amostra era descartada. Foram utilizados apenas os antioxidantes enzimáticos superóxido dismutase (SOD; 60 UI/mL), catalase (120 UI/mL) e glutationa peroxidase (5 UI/mL). A concentração de antioxidantes enzimáticos foi determinada baseada em resultados de pré-experimento verificando o efeito de diferentes concentrações de antioxidantes enzimáticos. Neste estudo piloto foram avaliados motilidade, vigor, integridade da membrana plasmática (eosina/nigrosina) e integridade do acrossomo (coloração simples Fast-Green/Rosa Bengala; dados não apresentados).

2- Antioxidantes não-enzimáticos: Nesta fase foram avaliados os tratamentos antioxidantes não enzimáticos (vitamina E, vitamina C e Glutationa reduzida) em diferentes concentrações (Quadro 2) e a combinação entre as vitaminas E e C (Quadro 3) em amostras provenientes de 8 testículos.

3- Ácido decosaexanóico (DHA) e antioxidantes: Nesta fase, as amostras forma tratadas com diferentes concentrações de DHA e posteriormente com a suplementação com antioxidantes (a melhor combinaçao; com e sem). Nesta fase, foram utilizadas amostras de 10 testículos.

Antioxiodantes	Concentração 1	Concentração 2	Concentração 3
Vitamina E (mM)	0,5	1,5	2,5
Vitamina C (mM)	1,5	3	4,5
Glutationa (mM)	0,5	1	5

Quadro 2- Antioxidantes e quantidades utilizadas na fase 1

Combinações	
Vitamina E	Vitamina C
Vitamina E	Glutationa
Superóxido dismutase	Catalase
Superóxido dismutase	Glutationa peroxidase
Superóxido dismutase	Vitamina E

Quadro 3 - Combinações antioxidantes utilizadas na fase 2

5.4.4 Criopreservação

Após a colheita e avaliação imediata do sêmen, as amostras epididimárias foram diluídas em meio Tris/glicerol até a concentração final de $10x10^6$ espermatozóides por palheta ($20x10^6$ espermatozóides/mL).

O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,50ml, em temperatura ambiente e acondicionado em bolsas plásticas, insufladas em ar e vedadas, colocadas em refrigerador, em temperatura de 5°C.

Após uma hora de refrigeração as palhetas foram acondicionadas horizontalmente, em estrutura de aço, onde só as extremidades estavam em contato com o metal. A estrutura de aço estava localizada à 3,5cm de distância da superfície do nitrogênio líquido, contido em caixa de isopor

Decorridos 20 minutos da exposição ao vapor de nitrogênio, as palhetas foram submersas no nitrogênio líquido, e em seguida colocadas em raques e transferidas rapidamente para as canecas do botijão de contendo nitrogênio líquido até a análise, que foi realizada após decorrida pelo menos uma semana do procedimento de criopreservação.

5.4.5 Descongelação do sêmen

A descongelação das amostras foi realizada pela imersão de duas palhetas, correspondentes a cada tratamento, em água à 37°C por 30 segundos; após este período, a palheta foi retirada e seca, com auxílio de papel toalha, seccionada na extremidade em que foi vedada, e a motilidade e o vigor do sêmen foram analisados de forma rotineira.

5.4.6 Testes Convencionais

Os testes convencionais, utilizados neste experimento, foram motilidade e vigor espermático.

5.4.7 Testes Funcionais

Os testes funcionais utilizados no presente experimento foram a avaliação da integridade acrossomal, da integridade da membrana plasmática, da atividade mitocondrial e da estrutura do DNA espermático.

5.4.7.1 Integridade acrossomal

Para a avaliação da integridade acrossomal foi utilizada a Coloração Simples Fast-Green/Rosa-Bengala (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991).

Para tanto, uma alíquota de cada amostra (5 µl) foi adicionada ao Corante Simples de Pope (5 µl), sendo a mistura incubada por 60 segundos em mesa aquecida à 37ºC. Após a incubação, foram feitos esfregaços sobre lâminas de microscopia, os quais foram analisados em microscópio convencional sob aumento de 1250 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como:

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

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

5.4.7.2 Integridade da membrana plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizada a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N), descrita por Barth e Oko (1989). Nesta coloração, por alterações na permeabilidade das membranas dos espermatozóides, a eosina consegue penetrar nas células corando-as 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 (5 µl) 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 1250 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como células com membrana íntegra (não coradas) e não-íntegra (coradas).

5.4.7.3 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 disso, é pré-requisito para as funções osmótica e sintética, motilidade e manutenção da estrutura celular. A técnica citoquímica desenvolvida por este autor é baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, o que inclui a CCO, através de uma reação em cadeia na qual o reagente é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, se restringe à mitocôndria. 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 aos que os espermatozóides são submetidos.

Para realização desta técnica, uma alíquota de 25µL de amostra foi incubada com 25µL 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 o grau de coloração da peça intermediária em 4 classes:

- Classe I: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada indicando alta atividade mitocondrial (DAB I).
- Classe II: células espermáticas com mais da metade dos segmentos corados (ativos) indicando atividade mitocondrial média a alta (DAB II).
- Classe III: células espermáticas com menos da metade dos segmentos corados (ativos) indicando alto comprometimento da atividade mitocondrial (DAB III).
- Classe IV: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV).

5.4.7.4 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 10^6 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 laranja de acridina ao DNA espermático. Após este período o sêmen foi incubado com 0,6ml de solução de laranja de acridina (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.

5.4.8 Resistência ao estresse oxidativo

As amostras criopreservadas de todas as fases foram submetidas ao teste de resistência ao estresse oxidativo. Para isto, após a descongelação, o crioprotetor foi removido através de dupla centrifugação (800G, 10 minutos) seguida de ressuspensão em solução fisiológica (NaCl 0,9%).

A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de sulfato de ferro (100µL; 4 mM) e ascorbato de sódio (100µL; 20 mM) à 0,4 mL da suspensão; subseqüentemente, a mistura foi incubada por 2 horas a 37ºC (GOMEZ et al., 1998). Posteriormente os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram avaliadas de acordo com protocolo descrito por Ohkawa et al. (1979) e recentemente utilizado por este grupo (NICHI et al., 2006). Esta técnica visa verificar a susceptibilidade de uma amostra espermática ao estresse oxidativo. Assim, uma amostra apresentando uma quantidade alta de TBARS indicaria uma amostra bastante susceptível ao estresse oxidativo.

5.4.9 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa do SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). O efeito dos diferentes tratamentos adicionados ao diluidor foram determinados pelo PROC GLM. Diferenças entre os tratamentos foram avaliadas por métodos paramétricos (teste t de Student para dois tratamentos ou teste LSD para mais de dois tratamentos) e não paramétricos (Wilcoxon), de acordo com a normalidade dos resíduos (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias.

Na análise do efeito dos antioxidantes enzimáticos, a variável porcentagem de células DAB III obedeceu às premissas após a transformação para raiz quadrada. A variável resposta

susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo (TBARS) obedeceu às premissas após a transformação de seus valores para 1/TBARS. As variáveis porcentagem de espermatozóides DAB IV e susceptibilidade do DNA espermático à denaturação obedeceram às premissas após transformação para logaritmo na base 10. As variáveis porcentagem de células com membrana íntegra (VIVOS), porcentagem de células com acrossomo íntegro (ACRO) obedeceram às premissas sem que fossem necessárias quaisquer transformações. As variáveis motilidade e vigor não obedeceram às premissas não sendo possível qualquer transformação. Esta variável foi analisada através de testes não paramétricos.

Para o efeito do tratamento com GSH, as variáveis resposta DAB III e IV obedeceram às premissas após a transformação de seus valores para logaritmo na base 10. A variável porcentagem de células com acrossomo íntegro (ACRO) obedeceu às premissas após a transformação quadrática de seus valores. A variável resposta susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo (TBARS) obedeceu às premissas após a transformação de seus valores para 1/TBARS. As variáveis resposta motilidade, vigor, porcentagem de células com membrana íntegra (VIVOS), porcentagem de células DAB I e II, susceptibilidade à denaturação (DNA) obedeceram às premissas sem que fosse necessária qualquer transformação.

No tratamento das amostras com Vitamina C, as variáveis resposta DAB II, III e IV, TBARS obedeceram às premissas após a transformação de seus valores para logaritmo na base 10. As variáveis resposta motilidade, vigor, VIVOS, ACRO, DAB I e DNA, obedeceram às premissas sem que fosse necessária qualquer transformação.

Para o efeito do tratamento com Vitamina E, as variáveis resposta motilidade, porcentagem de células DAB II e III obedeceram às premissas após a transformação de seus valores para logaritmo na base 10. A variável porcentagem de células DAB I obedeceu às premissas após a transformação quadrática de seus valores. As variáveis resposta susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo (TBARS) e vigor obedeceram às premissas após a transformação de seus valores para 1/TBARS e 1/vigor. As variáveis resposta ACRO, VIVOS e DNA obedeceram às premissas sem que fosse necessária qualquer transformação. A variável resposta porcentagem de células DAB IV não obedeceu às premissas não sendo possível qualquer transformação, sendo então analisada através de testes não paramétricos.

Para a análise do efeito da combinação entre as Vitaminas C e E, as variáveis motilidade, vigor, ACRO, VIVOS, DAB I, II e III, DNA. A variável TBARS obedeceu às

premissas após a transformação para logaritmo na base 10. Estas variáveis foram analisadas através pelo teste t de Student. A porcentagem de espermatozóides DAB IV não apresentaram distribuição normal, sendo então analisados pelo teste de Wilcoxon.

Para o efeito do tratamento com DHA, as variáveis resposta motilidade, ACRO, VIVOS, porcentagem de células DAB I, II III e IV e TBARS obedeceram às premissas após transformação para logaritmo na base 10. As variáveis vigor e DNA obedeceram às premissas sem que fosse necessária qualquer transformação.

Para o efeito do tratamento com DHA associado a GPx e SOD, as variáveis resposta motilidade obedeceram às premissas após a transformação para raiz quadrada. A variável DNA obedeceu às premissas após a transformação para logaritmo na base 10. A variável TBARS obedeceu às premissas após a transformação para 1/TBARS. As variáveis vigor, VIVOS, porcentagem de células DAB I, II, III e IV obedeceram às premissas sem que fosse necessária qualquer transformação.

Para o efeito do tratamento com DHA associado às vitaminas C e E, as variáveis motilidade, vigor, VIVOS, DAB III, SCSA e TBARS obedeceram às premissas após a transformação para logaritmo na base 10. As variáveis ACRO, DAB I, DAB II e DAB IV obedeceram às premissas sem que fosse necessária qualquer transformação.

Na análise do efeito do tratamento com DHA associado ao GSH e à GPx, as variáveis motilidade, VIVOS, DAB IV e TBARS obedeceram às premissas após a transformação para logaritmo na base 10. A variável vigor obedeceu às premissas após a transformação para 1/vigor. As variáveis ACRO, DAB I, DAB II, DAB III e SCSA obedeceram às premissas sem que fosse necessária qualquer transformação.

Um valor de probabilidade de $p < 0,05$ foi considerado significante. Os resultados foram descritos através de suas médias não transformadas ± os erros padrões das médias (EPM). As correlações de Pearson e Spearman foram utilizadas para calcular a relação entre as variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente, para cada um dos grupos de tratamentos avaliados.

Resultados

6 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo foram divididos em quatro seções referentes aos experimentos realizados.

6.1 *Resultados - Experimento 1*

A temperatura de estocagem do epidídimo apresentou efeito deletério na porcentagem de espermatozóides com gotas distais ($p < 0,0001$) e no total de gotas ($p < 0,0001$); epidídimos estocados a 34° C apresentaram maior porcentagem destas anormalidades quando comparadas aos estocados a 4° C (71,8 ± 4,73 e 81,8 ± 3,73% versus 23,7 ± 4,67 e 30,8 ± 4,98%, respectivamente, Tabela 1). Não foram encontradas diferenças entre a porcentagem de espermatozóides com gota proximal entre epidídimos estocados a 34 e a 4ºC (10,0 ± 3,66 e 7,01 ± 1,64%, respectivamente, p = 0,82, Tabela 1). Da mesma forma, a produção induzida de TBARS não foi influenciada pela temperatura (4 °C = 315,1 ± 52,1, e 34 °C = 346,1 ± 54,8 ng/1 × 10^6 espermatozóides, P = 0,77, Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito da temperatura de armazenamento de epidídimos bovinos (4 e 34ºC) nos níveis médios (± erro padrão da média -EPM) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) produzidos por espermatozóides epididimários submetidos ao desafio oxidativo, e na porcentagem de gotas proximais, distais e totais - Antuérpia - Bélgica - 2005

	4ºC	34ºC	P
TBARS (ng/10^6espermatozóides)	315,1 ± 52,1	346,1 ± 54,8	0,77
Gotais Proximais (%)	7,01 ± 1,64	10,0 ± 3,66	0,82
Gotas Distais (%)	23,7 ± 4,67	71,8 ± 4,73	<0,0001
Total de Gotas (%)	30,8 ± 4,98	81,8 ± 3,73	<0,0001

TBARS= Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

As taxas de desenvolvimento dos blastocistos foram maiores para amostras estocadas a 4ºC quando comparadas às armazenadas a 34° C (33,5 ± 1,76 e 21,2 ± 2,42%, respectivamente, P = 0,0002, Tabela 2). Esta diferença ocorreu principalmente pela diferença na porcentagem de blastocistos expandidos, que foi de 14,8 ± 1,78% para as amostras provenientes de epidídimos estocados a 4° C e 6,41 ± 1,16% para aquelas provenientes de epidídimos estocados a 34° C (P = 0,001; Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito da temperatura de armazenamento de epidídimos bovinos (4 e 34ºC) na capacidade fecundante *in vitro* de espermatozóides epididimários, reveladas pela proporção de blastocistos iniciais, normais, expandidos e eclodidos avaliados no dia 7 após fecundação - Antuérpia - Bélgica - 2005

	4ºC	34ºC	P
Blastocistos Iniciais (%)	6,12 ± 1,02	6,55 ± 0,56	0,231
Blastocistos Normais (%)	9,65 ± 1,15	6,92 ± 1,23	0,042
Blastocistos Expandidos (%)	14,8 ± 1,78	6,41 ± 1,16	0,001
Blastocistos Eclodidos (%)	3,03 ± 0,71	1,71 ± 0,55	0,086
Blastocistos Totais (%)	33,5 ± 1,76	21,2 ± 2,42	0,0002

Para amostras estocadas a 4 °C, os TBARS correlacionaram negativamente com as gotas distais (r = −0,63, P < 0,05, Figura 2) e positivamente com as gotas proximais (r = 0,42, P < 0,05, Figura 3).

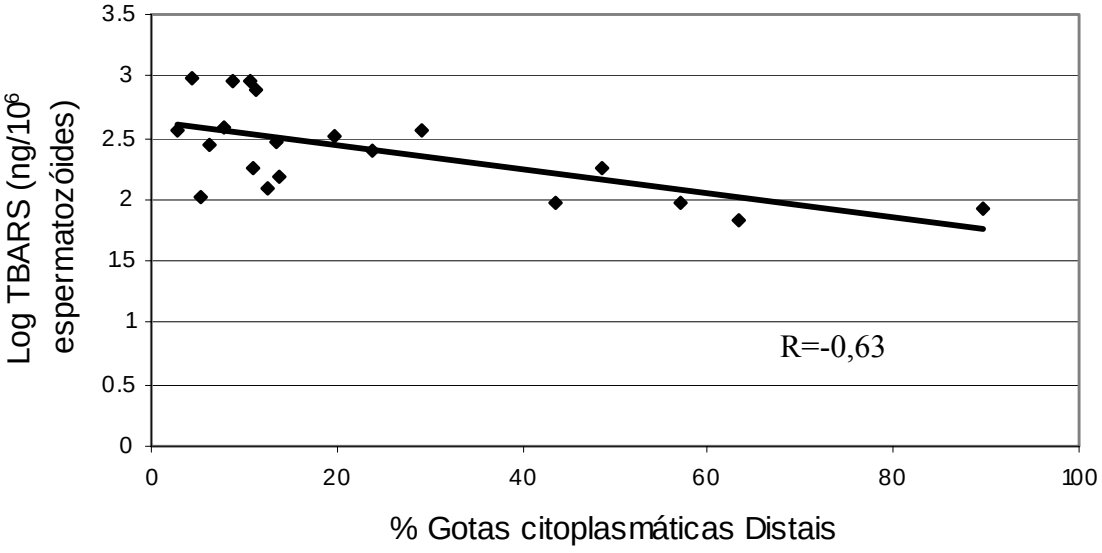


Figura 2- Análise de correlação entre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ng/10^6espermatozóides) e a porcentagem de espermatozóides com gotas citoplasmáticas distais ($p<0,05$) em amostras de epidídimo armazenadas a 4ºC - Antuérpia - Bélgica - 2005

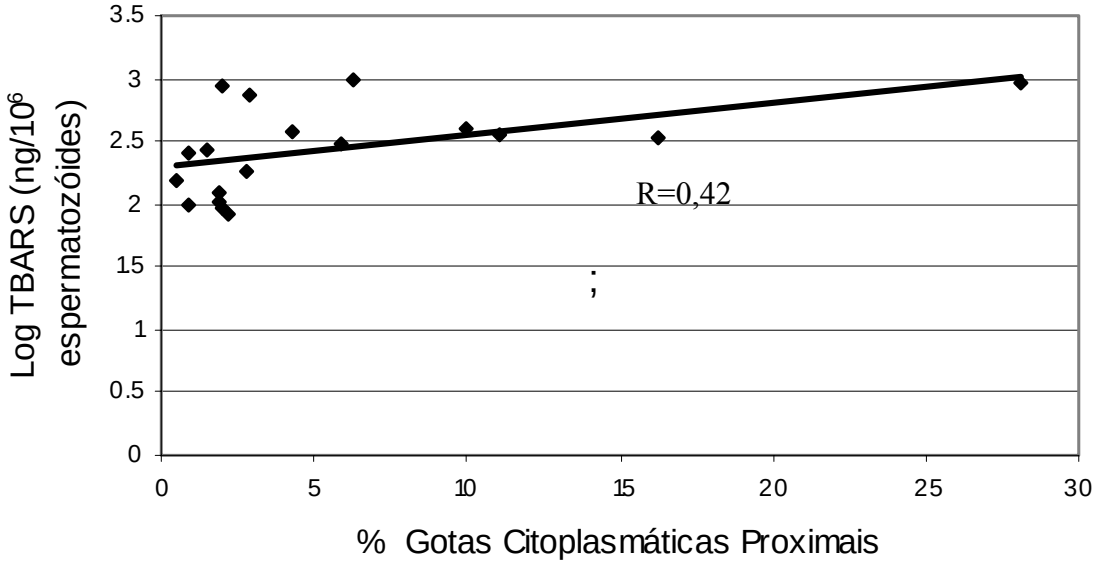


Figura 3 - Análise de correlação entre os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ng/10^6espermatozóides) e a porcentagem de espermatozóides com gotas citoplasmáticas proximais ($p<0.05$) em amostras de epidídimo armazenadas a 4ºC - Antuérpia - Bélgica - 2005

6.2 *Resultados - Experimento 2*

Interações entre a temperatura de armazenamento do epidídimo e a criopreservação foram encontradas para MOT, PROG e RAPID (p<0,05; Tabela 3). Assim, estas variáveis foram analisadas levando-se em conta os efeitos combinados da temperatura de armazenamento do epidídimo e da criopreservação (Tabela 4). As outras variáveis foram avaliadas considerando-se cada fator separadamente.

Tabela 3 - Efeitos da temperatura de armazenamento de epidídimos (4 vs 34ºC), da criopreservação (pré vs pós) e da interação temperatura x criopreservação nas variáveis avaliadas pela análise espermática computadorizada (CASA) e na análise concomitante da integridade da membrana e da atividade mitocondrial (SYBR-PI e JC-1) de amostras espermáticas criopreservadas de epidídimo - Gent - Bélgica - 2006

	Temperatura (P)	Criopreservação (P)	Temperatura x Criopreservação (P)
VAP	<0,0001	0,0223	0,2865
VSL	<0,0001	0,4911	0,4322
VCL	0,0002	0,0013	0,0825
ALH	0,0034	0,0026	0,2267
BCF	0,0057	0,3494	0,9487
STR	0,014	0,0882	0,5598
LIN	0,0061	0,0026	0,8053
MOT	0,0003	<0,0001	0,0379*
PROG	<0,0001	<0,0001	0,0157*
RAPID	0,0001	<0,0001	0,0241*
MEDIUM	0,2142	<0,0001	0,6589
SLOW	0,4552	0,4976	0,9741
STATIC	0,0017	<0,0001	0,0721
IM/HMP	0,0006	0,0003	0,9263
IM/LMP	0,1549	0,0341	0,3497
DM/LMP	0,0002	<0,0001	0,9247

*Interações significantes (p<0,05)
IM/HMP: Membrana intacta e alto potencial de membrana mitocondrial;
IM/LMP: Membrana intacta e baixo potencial de membrana mitocondrial;
DM/LMP: Membrana lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial.

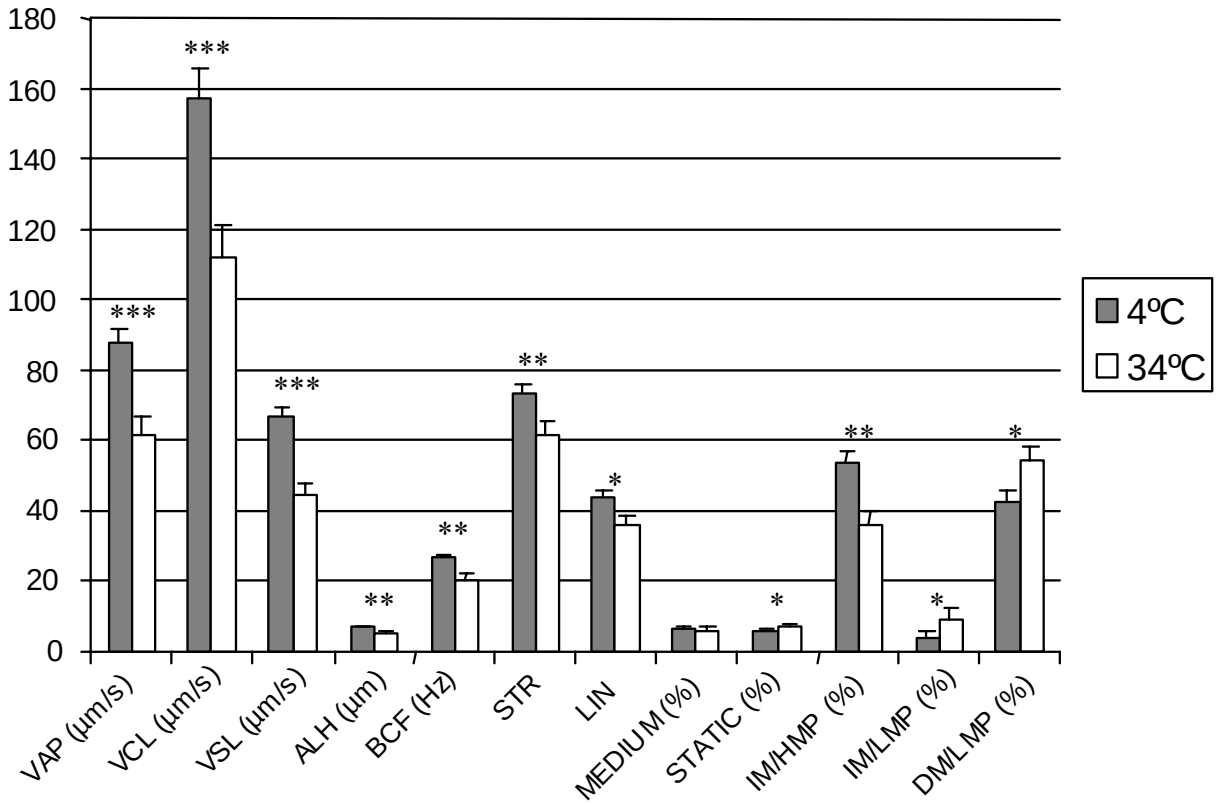
A temperatura mais alta de armazenamento do epidídimo apresentou um efeito negativo em todas as variáveis avaliadas (MOT, PROG e RAPID) antes do congelamento. Por outro lado, não foram observadas diferenças nos valores pós-descongelação destas variáveis (Tabela 4). Tanto para a variável MOT como para a RAPID, uma diminuição significativa foi observada nas amostras coletadas em epidídimos armazenados tanto a 4ºC como a 34ºC após a criopreservação, em relação ao sêmen fresco. Por sua vez, apenas quando os epidídimos foram armazenados a 4ºC, houve uma diminuição após a criopreservação para a variável PROG (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeito da temperatura de armazenagem do epidídimo (4 ou 34ºC) nas variáveis avaliadas pelo CASA antes e após a criopreservação - Gent - Bélgica - 2006

	Resultados do CASA pré		Resultados do CASA pós	
Temperatura de armazenamento	4ºC	34ºC	4ºC	34ºC
MOT (%)	59,62 ± 3,14[a]	32,10 ± 6,75[b]	16,21 ± 4,36[c]	9,72 ± 3,66[c]
PROG (%)	29,49 ± 1,81[a]	11,80 ± 2,59[b]	10,43 ± 3,15[b]	5,07 ± 2,30[b]
RAPID (%)	51,19 ± 3,30[a]	25,32 ± 5,74[b]	12,66 ± 3,72[c]	6,84 ± 3,05[c]

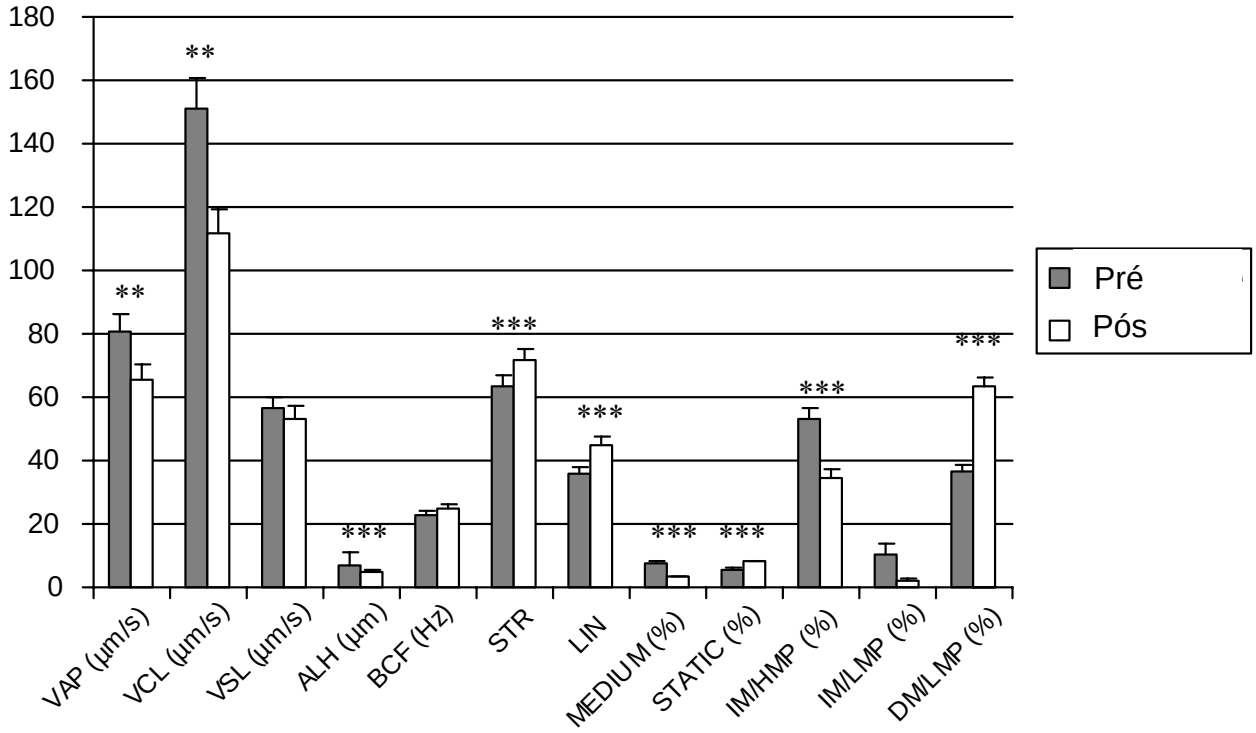
[a,b,c]: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas ($p<0.05$)

Em relação às variáveis nas quais não foram observadas interações, a temperatura de armazenamento do epidídimo afetou todas as variáveis, com exceção da porcentagem de espermatozóides com velocidade média (MEDIUM; 4ºC=6,36 ± 0,65, e 34ºC=5,02 ± 0,85%; p=0,11, Figura 4). Na comparação entre amostras pré e pós (antes e após a criopreservação, Figura 5), também para as variáveis que não apresentaram interação, não houve diferenças para as variáveis VSL, BCF e na porcentagem de espermatozóides que apresentaram membrana intacta e baixo potencial de membrana mitocondrial (IM/LMP; 56,78 ± 3,54, 22,65 ± 1,39, e 10,44 ± 3,34 % versus 53,16 ± 3,98, 24,51 ± 1,79, e 2,35 ± 0,56, respectivamente; p > 0,05). A criopreservação afetou significativamente todas as outras variáveis (VAP, ALH, BCF, STR, LIN, MEDIUM, STATIC, IM/HMP, DM/LMP; Figura 5).



* p < 0.05
** p < 0.01
*** p < 0.0001
Para o texto completo das abreviações relacionados ao CASA, ver Quadro 1.
IM/HMP: Membrana intacta e alto potencial de membrana mitocondrial;
IM/LMP: Membrana intacta e baixo potencial de membrana mitocondrial;
DM/LMP: Membrana lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial.

Figura 4 - Efeito da temperatura de armazenamento de epidídimos bovinos (4 versus 34ºC) nas variáveis avaliadas com o CASA e na avaliação concomitante da integridade de membrana e atividade mitocondrial (SYBR-PI e JC-1) de amostras espermáticas epididimárias - Gent - Bélgica - 2006



* p < 0.05
** p < 0.01
*** p < 0.0001
Para o texto completo das abreviações relacionados ao CASA, ver Quadro 1.
IM/HMP: Membrana intacta e alto potencial de membrana mitocondrial;
IM/LMP: Membrana intacta e baixo potencial de membrana mitocondrial;
DM/LMP: Membrana lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial.

Figura 5 – Efeito da criopreservação (Pré versus Pós) nas variáveis avaliadas com o CASA e na avaliação concomitante da integridade de membrana e atividade mitocondrial (SYBR-PI e JC-1) de amostras espermáticas epididimárias - Gent - Bélgica - 2006

Para as amostras coletadas de epidídimos armazenados a 4ºC antes da criopreservação, correlações foram encontradas entre as variáveis SLOW e ambas as porcentagens de IM/HMP e IM/LMP (-0,48 e 0,48, respectivamente; p<0,05; Tabela 5). Quando os epidídimos foram armazenados a 34ºC antes da criopreservação, a porcentagem de IM/HMP correlacionou-se positivamente com as variáveis MOT, RAPID e PROG, e negativamente com STATIC (p<0,05, Tabela 6a). Por outro lado, a porcentagem de espermatozóides IM/LMP correlacionou-se negativamente com MOT, PROG, e RAPID, e positivamente com STATIC (p<0.05; Tabela 6a). Após a criopreservação e posterior descongelação, em amostras coletadas de epidídimos armazenados a 4ºC foram observadas correlações entre MOT e as porcentagens de IM/HMP and DM/LMP (0,56 e -0,4, respectivamente; p<0,05; Tabela 5).

Para os epidídimos armazenados a 34ºC após o congelamento, a porcentagem de espermatozóides com IM/HMP correlacionou-se positivamente com MOT, PROG, RAPID, BCF, VAP, VCL, VSL e ALH, e negativamente com STATIC ($p < 0,05$; Tabela 6b). Da mesma forma, a porcentagem de células com DM/LMP correlacionou-se positivamente com STATIC e negativamente com MOT, PROG, RAPID, BCF, VCL, VAP, VSL, e SLOW ($p < 0,05$; Tabela 6b).

Tabela 5 - Correlações observadas entre as variáveis avaliadas pelo CASA e as avaliadas através da coloração tripla (SYBR-PI e JC-1) em amostras espermáticas epididimárias armazenadas a 4ºC antes e após a da criopreservação ($p<0.05$) - Gent - Bélgica - 2006

	IM/HMP Pré	IM/LMP Pré	MOT Pós
SLOW Pré	-0,48	0,48	n.s.
IM/HMP Pós	n.s.	n.s.	0,56
DM/LMP Pós	n.s.	n.s.	-0,54

IM/HMP: Membrana intacta e alto potencial de membrana mitocondrial;
IM/LMP: Membrana intacta e baixo potencial de membrana mitocondrial;
DM/LMP: Membrana lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial;
n.s.: Não significante.

Tabela 6 - Correlações observadas entre as variáveis avaliadas pelo CASA e as avaliadas através da coloração tripla (SYBR-PI e JC-1) em amostras espermáticas epididimárias armazenadas a 34ºC antes (a) e após (b) a criopreservação ($p<0.05$) - Gent - Bélgica - 2006

(a)

	Pré-congelação			
	MOT	PROG	RAPID	STATIC
IM/HMP	0,5	0,50	0,50	-0,57
IM/LMP	-0,61	-0,60	-0,58	0,58

(b)

	Post-thaw values									
	MOT	PROG	RAPID	STATIC	BCF	VAP	VCL	VSL	ALH	SLOW
IM/HMP	0,74	0,71	0,71	-0,73	0,68	0,59	0,59	0,57	0,56	n.s.
DM/LMP	-0,79	-0,78	-0,78	0,79	-0,64	-0,59	-0,59	-0,57	n.s.	-0,53

IM/HMP: Membrana intacta e alto potencial de membrana mitocondrial;
IM/LMP: Membrana intacta e baixo potencial de membrana mitocondrial;
DM/LMP: Membrana lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial;
n.s.: Não significante.

6.3 *Resultados - Experimento 3*

Podemos observar que houve um efeito significante da temperatura de armazenamento do testículo (4 ou 34ºC) sobre a fecundidade *in vitro* das amostras criopreservadas. Amostras espermáticas provenientes de testículos armazenados a 4ºC apresentaram maiores taxa de blastocistos expandidos, blastocistos eclodidos e blastocistos totais quando comparadas às amostras coletadas de testículos armazenados à 34ºC (Tabela 7; 10,10 ± 1,44, 6,82 ± 1,72, 24,59 ± 2,51 versus 5,56 ± 2,11, 2,22± 0,77, 13,57 ± 2,99, respectivamente; $p<0,05$). Não houve efeito significante da temperatura de armazenamento na susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo. Os resultados encontrados no experimento 2 indicam que, após a criopreervação, não foram encontradas diferenças significativas no

Tabela 7 - Efeito da temperatura de armazenagem do epidídimo (4 ou 34ºC) na fecundidade *in vitro* e na resistência dos espermatozóides ao estresse oxidativo (TBARS) após a criopreservação do sêmen epididimário - Gent -, Bélgica - 2006

	Temperatura de armazenamento		
	4ºC	34ºC	p
Blastocistos Iniciais (%)	2,57 ± 0,73	2,49 ± 0,51	0,3521
Blastocistos Normais (%)	5,11 ± 1,02	3,30 ± 0,85	0,1130
Blastocistos Expandidos (%)	10,10 ± 1,44	5,56 ± 2,11	0,0336
Blastocistos Eclodidos (%)	6,82 ±1,72	2,22 ± 0,77	0,0289
Blastocistos Totais (%)	24,59 ± 2,51	13,57 ± 2,99	0,0023
TBARS (ng/10^6 espermatozóides)	562,32 ± 142,58	482,63 ± 110,50	0,6587

Foram observadas, nas amostras coletadas de epidídimos armazenados à 4ºC, correlações negativas entre a susceptibilidade das células espermáticas ao estresse oxidativo e as taxas de blastocistos expandidos ($r=-0,5$; $p=0,049$) e blastócitos totais ($r=-0,75$; $p=0,0046$; Tabela 8). Observou-se também, correlações positivas entre a taxa de blastocistos normais e a

porcentagem de células com membrana íntegra e baixo potencial de membrana mitocondrial (r=0,51; p=0,062) e entre a taxa de blastocistos expandidos e a porcentagem de células com membrana íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (r=0,56; p=0,036; Tabela 8).

Já nas amostras coletadas de epidídimos armazenados à 34ºC, foram observadas correlações positivas entre a susceptibilidade das células espermáticas ao estresse oxidativo e as taxas de blastocitos normais (r=0,62; p=0,0235), blastocistos expandidos (r=0,56; p=0,0481) e blastocitos totais (r=0,49; p=0,085; Tabela 8). Observaram-se também correlações positivas entre blastocistos expandidos e a porcentagem de células com membrana íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (r=0,60; p=0,0172), e o BCF (r=0,53; p=0,0396). Também para a taxa de blastocistos expandidos, foram encontradas correlações negativas com a porcentagem de células com membrana lesada e baixo potencia de membrana mitocondrial (r=-0,56; p=0,0308), com a porcentagem de células com movimento médio (r=0,67; p=0,0061) e com a porcentagem de células estáticas (r=-0,61; p=0,016; Tabela 9). A taxa de blastocistos eclodidos correlacionou-se positivamente com a porcentagem de células com membrana íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (r=0,69; p=0,004) e com a porcentagem de células com movimento médio (r=0,49, p=0,0627); e negativamente com a porcentagem de células com membrana lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial (r=-0,67; p=0,0067) e com a porcentagem de células estáticas (r=-0,49; p=0,0612).

Tabela 8 – Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta porcentagens de blastocistos iniciais, normais, expandidos, eclodidos e totais, concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), características de motilidade avaliadas pelo CASA, resultados da coloração tripla (SYBR/IP/JC1) de amostras espermáticas criopreservadas coletadas de epidídimos armazenados a 4ºC - Gent - Bélgica - 2006

	TBARS (ng/10^6sptz)	IM/HMP	IM/LMP	DM/LMP	MEDIO	ESTATICO
Blastocistos Iniciais (%)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-0,63 (0,195)	n.s.
Blastocistos Normais (%)	n.s.	n.s.)	0,51 (0,062)	n.s.	n.s.	n.s.
Blastocistos Expandidos (%)	-0,50 (0,049)	0,56 (0,036)	n.s.	-0,58 (0,0289)	n.s.	-0,53 (0,063)
Blastocistos Eclodidos (%)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Blastocistos Totais (%)	-0,75 (0,0046)	n.s.	n.s.	-0,48 (0,07)	n.s.	n.s.

IM/HMP: Membrana intacta e alto potencial de membrana mitocondrial;
IM/LMP: Membrana intacta e baixo potencial de membrana mitocondrial;
DM/LMP: Membrana lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial;
n.s.: Não significante.

Tabela 9 – Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta porcentagens de blastocistos iniciais, normais, expandidos, eclodidos e totais, concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), características de motilidade avaliadas pelo CASA, resultados da coloração tripla (SYBR/IP/JC1) de amostras espermáticas criopreservadas coletadas de epidídimos armazenados a 34ºC - Gent - Bélgica - 2006

	TBARS (ng/10^6sptz)	IM/HMP	IM/LMP	DM/LMP	MEDIO	BCF	ESTATICO
Blastocistos Iniciais (%)	n.s.	n.s.	0,046 (0,083)	n.s.	-n.s.	n.s.	n.s.
Blastocistos Normais (%)	0,62 (0,0235)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Blastocistos Expandidos (%)	0,56 (0,0481)	0,60 (0,0172)	n.s.	-0,56 (0,0308)	0,67 (0,0061)	0,53 (0,0396)	-0,61 (0,016)
Blastocistos Eclodidos (%)	n.s.	0,69 (0,004)	n.s.	-0,67 (0,0067)	0,49 (0,0627)	n.s.	-0,49 (0,0612)
Blastocistos Totais (%)	0,49 (0,085)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

IM/HMP: Membrana intacta e alto potencial de membrana mitocondrial;
IM/LMP: Membrana intacta e baixo potencial de membrana mitocondrial;
DM/LMP: Membrana lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial;
n.s.: Não significante.

6.4 *Resultados - Experimento 4*

Como descrito anteriormente, os resultados serão divididos de acordo com a natureza do tratamento realizado, a saber: 1- efeito do tratamento com antioxidante enzimático; 2– efeito do tratamento com antioxidante não enzimático; 3– efeito do tratamento com DHA e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

6.4.1 Efeitos dos antioxidantes enzimáticos

Em experimento piloto, utilizando como variáveis resposta a avaliação motilidade, vigor e integridade de membrana e acrossomo, optou-se pela utilização das dosagens de 120, 60 e 5 UI/mL para a catalase, a superóxido dismutase (SOD) e a glutationa peroxidase, respectivamente. Tanto no teste piloto como nos resultados encontrados no presente experimento, pode-se observar que a catalase não apresentou resultados satisfatórios para a maioria das variáveis estudadas (Tabela 10). Podemos observar que a SOD apresentou os melhores resultados, sendo que, em comparação ao controle, as amostras tratadas com esta enzima apresentaram maior atividade mitocondrial e maior resistência ao estresse oxidativo induzido. Quando comparadas ao controle, as amostras tratadas com SOD apresentaram maior porcentagem de células DAB I (52,27 ± 5,17 e 65,93 ± 2,89%, respectivamente) e menor porcentagem de células DAB IV (7,86 ± 1,20 e 3,64 ± 0,72%, respectivamente). Em relação aos níveis de TBARS, observou-se uma menor produção em amostras tratadas com SOD quando comparadas ao controle (350,67 ± 21,21 e 517,84 ± 90,17 ng/10^6 espermatozóides, respectivamente). Para as amostras tratadas com GPx, observou-se uma correlação negativa entre TBARS e a porcentagem de células com acrossomo íntegro (r=-0,85; p=0,0325). Devido aos resultados insatisfatórios da catalase, optou-se por não utilizá-la na seqüência do experimento.

Tabela 10 – Efeito da concentração de Catalase, Superóxido Dismutase (SOD) e Glutationa Peroxidase (GPx) nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V), susceptibilidade do DNA à denaturação (DNA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009

	Controle	Catalase 120 UI/mL	SOD 60 UI/Ml	GPx 5 UI/mL
MOTILIDADE (%)	22,50 ± 4,23[a]	5,56 ± 1,00[b]	16,71 ± 5,39[a]	17,86 ± 3,59[a]
VIGOR (%)	1,90 ± 0,27	1,44 ± 0,28	1,86 ± 0,37	1,71 ± 0,30
VIVOS (%)	36,59 ± 3,51[a]	21,42 ± 4,93[b]	36,14 ± 4,86[a]	32,71 ± 3,44[ab]
ACROSSOMO (%)	61,95 ± 7,18[ab]	48,19 ± 8,43[b]	75,07 ± 4,51[a]	70,92 ± 5,74[ab]
DAB I (%)	52,27 ± 5,17[a]	22,79 ± 2,65[c]	65,93 ± 2,89[b]	63,57 ± 2,98[ab]
DAB II (%)	24,14 ± 2,68[a]	33,71 ± 2,38[b]	21,00 ± 3,86[a]	22,36 ± 3,02[a]
DABIII (%)	15,73 ± 2,98[a]	34,54 ± 2,11[b]	9,43 ± 1,38[a]	9,57 ± 1,66[a]
DAB IV (%)	7,86 ± 1,20a[b]	8,96 ± 1,43[a]	3,64 ± 0,72[c]	4,50 ± 0,92[bc]
DNA (%)	10,03 ± 2,07	9,02 ± 1,98	7,67 ± 1,20	8,71 ± 1,76
TBARS (ng/10^6 sptz)	517,84 ± 90,17[a]	453,45 ± 45,58[ab]	350,67 ± 21,21[b]	431,4 ± 26,35[ab]

[a, b, c]: Letras diferentes indicam diferenças estatísticas dentro das linhas (teste LSD, $p<0,05$).

Não foram encontradas diferenças entre o tratamento com a combinação GPX e SOD e o grupo controle para nenhuma das variáveis avaliadas (Tabela 11). Por outro lado, verificou-se correlações negativas entre a porcentagem de células com membrana íntegra e a porcentagem de células DAB III e IV ($r=-0,73$; $p=0,0352$ e $r=-0,69$; $p=0,0478$, respectivamente).

Tabela 11 – Efeito da concentração de combinação entre glutationa peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V), susceptibilidade do DNA à denaturação (DNA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009

	Controle	GPx (5 UI/mL) SOD (20 UI/mL)	P
MOTILIDADE (%)	24,28 ± 5,82	11,43 ± 3,73	0,09
VIGOR (%)	2,00 ± 0,34	1,43 ± ± 0,17	0,16
VIVOS (%)	33,21 ± 4,00	29,28 ± 4,21	0,51
ACROSSOMO (%)	67,17± 5,12	70,43 ± 6,88	0,72
DAB I (%)	63,64 ± 2,58	62,71 ± 3,39	0,83
DAB II (%)	19,57± 2,88	22,86 ± 2,69	0,42
DABIII (%)	9,21 ± 1,07	9,28 ± 1,47	0,77
DAB IV (%)	7,21 ± 1,72	5,71 ± 1,43	0,43
DNA (%)	10,03 ± 2,07	9,65 ± 1,58	0,97
TBARS (ng/10^6 sptz)	517,84 ± 90,17	401,08 ± 33,42	0,21

6.4.2 Efeitos dos antioxidantes não-enzimáticos

Não foram observados efeitos significativos do tratamento com GSH para nenhuma das variáveis estudadas (Tabela 12). No entanto, algumas correlações interessantes foram encontradas. Verificou-se que a susceptibilidade do DNA espermático à denaturação (SCSA) correlacionou-se positivamente com a porcentagem de células DAB I (r=0,64; p=0,0039) e negativamente com a porcentagem de células DAB III e IV (r=-0,66; r=0,0028 e r=-0,66; p=0,0027, respectivamente). Além disto, a susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo (TBARS), correlacionou-se negativamente com a as porcentagens de células com membrana e acrossomo íntegros (r=-0,87; p<0,0001 e r=-0,73; p=0,0033, respectivamente).

Tabela 12 – Efeito da concentração de Glutationa (GSH) nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V), susceptibilidade do DNA à denaturação (DNA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009

	Controle	GSH 1 mM	GSH 5 mM	GSH 10 mM
MOTILIDADE (%)	26,00 ± 7,31	25,00 ± 6,89	21,67 ± 5,72	22,50 ± 5,74
VIGOR (%)	1,9 ± 0,33	1,8 ± 0,41	1,75 ± 0,17	1,83 ± 0,24
VIVOS (%)	36,7 ± 6,47	36,50 ± 5,26	35,20 ± 3,27	45,51 ± 5,98
ACROSSOMO (%)	75,20 ± 5,53	69,9 ± 7,74	72,6 ± 9,64	75,9 ± 9,21
DAB I (%)	63,12 ± 8,72	55,92 ± 8,43	63,58 ± 7,11	67,25 ± 8,46
DAB II (%)	20,00 ± 3,32	21,42 ± 2,74	17,92 ± 2,03	16,08 ± 2,58
DABIII (%)	11,25 ± 3,98	14,33 ± 3,32	11,75 ± 3,15	9,92 ± 2,51
DAB IV (%)	5,62 ± 2,13	8,33 ± 3,41	6,75 ± 2,52	6,75 ± 4,66
DNA (%)	6,37 ± 0,9	6,60 ± 0,88	6,64 ± 1,10	7,83 ± 1,32
TBARS (ng/10^6 sptz)	579,55 ±147,62	851,18 ± 430,54	554,23 ± 89,73	595,33 ± 144,72

Verificou-se um efeito protetor da Vitamina C em relação à atividade mitocondrial. Amostras tratadas com 4,5 mM de Vitamina C apresentaram menor porcentagem de espermatozóides com nenhuma atividade mitocondrial (DAB IV) quando comparadas ao controle (2,33 ± 0,63 e 5,62 ± 2,1%, respectivamente; Tabela 13). Além disto, verificou-se que a susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo (TBARS) correlacionou positivamente com a porcentagem de células DAB III (r=0,63; p=0,0068) e negativamente com a porcentagem de células com acrossomo íntegro (r=-0,59; p=0,0275). Além disso verificou-se uma correlação negativa entre a porcentagem de células DAB III e a porcentagem de células com membrana íntegra (r=-0,58; p=0,0239).

Tabela 13 – Efeito da concentração de Vitamina C nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009

	Controle	Vitamina C 1 mM	Vitamina C 3 mM	Vitamina C 4,5 mM
MOTILIDADE (%)	26,00 ± 7,31	29,00 ± 8,57	17,83 ± 6,88	22,50 ± 5,44
VIGOR (%)	1,9 ± 0,33	2,10 ± 0,33	1,75 ± 0,36	2,17 ± 0,33
VIVOS (%)	36,7 ± 6,47	37,90 ± 7,52	31,60 ± 5,67	34,40 ± 5,76
ACROSSOMO (%)	75,20 ± 5,53	75,00 ± 11,03	68,40 ± 10,03	71,20 ± 8,52
DAB I (%)	63,12 ± 8,72	69,17 ± 5,58	75,08 ± 5,58	73,42 ± 5,13
DAB II (%)	20,00 ± 3,32	17,50 ± 4,60	14,00 ± 3,19	16,17 ± 3,67
DABIII (%)	11,25 ± 3,98	8,83 ± 14,43	7,83 ± 2,11	8,08 ± 1,20
DAB IV (%)	5,62 ± 2,13[a]	4,50 ± 1,02[ab]	3,08 ± 0,68[ab]	2,33 ± 0,63[b]
DNA (%)	6,37 ± 0,9	7,78 ± 1,49	6,67 ± 1,04	6,68 ± 0,48
TBARS (ng/10^6 sptz)	579,55 ±147,62	409,76 ± 59,67	456,28 ± 74,16	426,38 ± 85,95

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

O tratamento com vitamina E apresentou um efeito negativo na motilidade espermática, sendo que as concentrações de 0,5 e 1,5 mM apresentaram motilidade significantemente menor em relação ao controle (10,00 ± 2,24, 6,67 ± 1,67 e 26,00 ± 7,31%, respectivamente; Tabela 14). Por outro lado, houve um efeito positivo na susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo, com o controle apresentando maiores níveis de TBARS quando comparado à concentração de 2,5 mM de vitamina E (579,55 ±147,62 e 291,48 ± 16,74 ng/10^6 espermatozóides, respectivamente). Foram observadas, nas amostras tratadas com Vitamina E, que os níveis de TBARS correlacionaram significativamente com a atividade mitocondrial. Foram encontradas correlações positivas entre TBARS e DAB II, III e IV ($r=-0,48$; $p=0,0337$, $r=0,69$; $p=0,0008$ e $r=0,77$; $p<0,0001$, respectivamente) e negativa entre TBARS e DAB I ($r=-0,65$; $p=0,002$). Verificou-se também que a atividade mitocondrial correlacionou-se fortemente com a porcentagem de células com membrana íntegra (VIVOS), sendo encontradas correlações negativas entre esta última e a porcentagem de células DAB II, III e IV ($r=-0,81$; $p=0,0002$, $r=-0,68$; $p=0,0051$ e $r=-0,72$; $p=0,0025$, respectivamente) e uma correlação negativa entre VIVOS e DAB I ($r=0,80$; $p=0,0004$).

Tabela 14 – Efeito da concentração de Vitamina E nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V), susceptibilidade do DNA à denaturação (DNA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009

	Controle	Vitamina E 0,5 mM	Vitamina E 1,5 mM	Vitamina E 2,5 mM
MOTILIDADE (%)	26,00 ± 7,31[a]	10,00 ± 2,24[b]	6,67 ± 1,67[b]	15,00 ± 7,07[ab]
VIGOR (%)	1,90 ± 0,33	1,17 ± 0,17	1,33 ± 0,25	1,67 ± 0,44
VIVOS (%)	36,7 ± 6,47	31,70 ± 7,87	38,40 ± 6,77	35,30 ± 9,13
ACROSSOMO (%)	75,20 ± 5,53	55,70 ± 14,62	67,80 ± 10,03	64,70 ± 10,51
DAB I (%)	63,12 ± 8,72	72,17 ± 7,55	72,42 ± 6,23	73,00 ± 7,15
DAB II (%)	20,00 ± 3,32	15,58 ± 3,18	16,08 ± 3,81	16,30 ± 4,73
DABIII (%)	11,25 ± 3,98	8,17 ± 3,29	8,50 ± 2,09	8,10 ± 1,91
DAB IV (%)	5,62 ± 2,13	4,08 ± 1,23	3,00 ± 0,62	2,60 ± 0,89
DNA (%)	6,37 ± 0,9	7,21 ± 1,20	6,87 ± 1,06	7,74 ± 1,43
TBARS (ng/10^6 sptz)	579,55 ±147,62[a]	390,00 ± 80,56[ab]	434,25 ± 62,23[ab]	291,48 ± 16,74[b]

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

Não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras tratadas ou não com a combinação entre Vitamina C e Vitamina E (Tabela 15). Verificou-se uma correlação negativa significante entre TBARS e a porcentagem de células DAB I ($r=-0,79$; $p=0,04$).

Tabela 15 – Efeito da concentração de combinação das Vitaminas C e E nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V), susceptibilidade do DNA à denaturação (DNA) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009

	Controle	Vitamina C (3 mM) + Vitamina E (2 mM)	p
MOTILIDADE (%)	14,00 ± 1,87	14,33 ± 5,14	0,95
VIGOR (%)	1,50 ± 0,16	1,50 ± 0,26	1
VIVOS (%)	52,25 ± 11,90	55,08 ± 10,07	0,86
ACROSSOMO (%)	79,83 ± 3,39	80,33 ± 3,95	0,92
DAB I (%)	50,83 ± 2,87	50,80 ± 4,59	0,99
DAB II (%)	28,75 ± 1,66	34,20 ± 3,75	0,19
DABIII (%)	12,42 ± 1,04	8,90 ± 2,30	0,17
DAB IV (%)	8,00 ± 2,50	6,10 ± 1,59	0,50
DNA (%)	5,40 ± 0,65	4,57 ± 0,37	0,29
TBARS (ng/10^6 sptz)	243,83 ± 66,04	181,50 ± 20,56	0,39

6.4.3 Efeito do Ácido Decosa-hexanóico (DHA) e antioxidantes

Podemos verificar que o tratamento com quantidades crescentes de DHA provocou um aumento nos níveis de TBARS, sendo que foi encontrada diferença entre o controle e a concentração de 10 µM (178,26 ± 9,55 e 514,28 ± 43,34 ng/10^6 espermatozóides, respectivamente; Tabela 16). Por outro lado, a motilidade foi significativamente mais alta para amostras tratadas com 5 µM quando comparada com a encontrada nas amostras tratadas com 10 µM (21,83 ± 7,17 e 7,17 ± 3,39, respectivamente). Foram encontradas correlações entre a porcentagem de células com membrana íntegra e a porcentagem de células com acrossomo íntegro, a porcentagem de células DAB I e DAB II (r=0,70; p=0,0012, r=0,53; p=0,0294 e r=-0,61; p=0,009, respectivamente). A porcentagem de células com acrossomo íntegro correlacionou-se com a porcentagem de células DAB I, II e III (r=0,63; p=0,0066, r=-0,62; p=0,0081 e r=-0,52; p=0,0326, respectivamente).

Tabela 16 – Efeito da concentração de ácido decosa-hexanóico (DHA) nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009

	Controle	DHA (1 µM)	DHA (5 µM)	DHA (10 µM)
MOTILIDADE (%)	14,00 ± 1,87[ab]	12,00 ± 3,39[ab]	21,83 ± 7,17[a]	7,17 ± 3,39[b]
VIGOR (%)	1,50 ± 0,16	1,60 ± 0,19	1,92 ± 0,33	1,42 ± 0,24
VIVOS (%)	52,25 ± 11,90	59,42 ± 7,83	55,33 ± 8,13	55,50 ± 8,13
ACROSSOMO (%)	79,83 ± 3,39	84,17 ± 3,38	83,08 ± 3,74	83,08 ± 3,93
DAB I (%)	50,83 ± 2,87	53,75 ± 6,77	47,70 ± 9,20	51,42 ± 5,40
DAB II (%)	28,75 ± 1,66	27,08 ± 3,56	31,30 ± 7,93	28,83 ± 2,02
DABIII (%)	12,42 ± 1,04	10,17 ± 2,64	14,90 ± 3,37	11,42 ± 3,00
DAB IV (%)	8,00 ± 2,50	9,00 ± 1,93	6,10 ± 0,78	8,33 ± 1,31
DNA (%)	5,40 ± 0,65	5,21 ± 0,39	4,25 ± 0,50	4,36 ± 0,50
TBARS (ng/10^6 sptz)	178,26 ± 9,55[a]	229,97 ± 18,26[ab]	298,15 ± 53,19[b]	514,28 ± 43,34[c]

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

Observou-se que a adição de DHA associada a superóxido dismutase ao diluidor permitiu um aumento da motilidade espermática em comparação ao controle (34,43 ± 4,12 e 24,28 ± 4,82%, respectivamente; Tabela 17). Por outro lado, nas amostras tratadas observou-se uma correlação negativa entre VIVOS e a porcentagem de células DAB III ($r=-0,50$; $p=0,01$).

Tabela 17 – Efeito da concentração de ácido decosa-hexanóico (DHA) associado a antioxidantes glutationa peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), combinados ou não, nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009

	Controle	DHA (5 µM) + GPx (5 UI/mL)	DHA (5 µM) + SOD (20 UI/mL)	DHA (5 µM) + GPx (5UI/mL) + SOD (20 UI/mL)
MOTILIDADE (%)	24,28 ± 4,82[a]	28,57 ± 5,95[ab]	34,43 ± 4,12[b]	25,14 ± 6,36[a]
VIGOR (%)	2,00 ± 0,34	2,07 ± 0,25	3,14 ± 0,24	1,93 ± 0,20
VIVOS (%)	33,21 ± 4,00	33,71 ± 6,63	29,78 ± 5,21	30,50 ± 5,38
ACROSSOMO (%)	67,17 ± 5,12	63,50 ± 6,97	62,83 ± 3,97	66,64 ± 4,38
DAB I (%)	63,64 ± 2,58	56,00 ± 4,11	63,21 ± 4,07	61,07 ± 3,93
DAB II (%)	19,57 ± 2,88	26,00± 3,06	22,64 ± 3,45	22,07 ± 2,97
DABIII (%)	9,57 ± 1,07	11,21 ± 2,11	8,78 ± 0,94	11,07± 1,76
DAB IV (%)	7,21 ± 1,72	6,79 ± 1,07	5,36 ± 0,95	5,78 ± 0,82
DNA (%)	10,03 ± 2,07	7,68 ± 1,65	9,74 ± 2,50	8,78 ± 2,29
TBARS (ng/10^6 sptz)	517,84 ± 90,17	518,35 ± 41,73	471,91 ± 36,57	573,23 ± 38,21

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

Nas amostras tratadas com a associação DHA/Vitamina E, observou-se um a diminuição na atividade mitocondrial em comparação ao controle, refletido pela diferença significante na porcentagem de espermatozóides DAB II (28,00 ± 3,29 e 21,09 ± 2,74%, respectivamente) e DAB I (49,83 ± 4,92 e 64,00 ± 1,90%, respectivamente; Tabela 18). Observou-se também que houve uma diminuição na porcentagem de membranas íntegras nas amostras tratadas com DHA e Vitamina E quando comparadas com as amostras tratadas com a associação DHA/Vitamina C/Vitamina E (22,00± 2,12 e 34,14 ± 4,27%, respectivamente). A porcentagem de células com membrana íntegra (VIVOS), correlacionou-se positivamente com a porcentagem de células DAB I (r=0,62; p=0,023) e negativamente com a porcentagem de células DAB IV (r=-0,47; p=0,0423). Verificou-se também correlações negativas entre motilidade e a porcentagem de células DAB IV (r=-0,54; p=0,0475) e a susceptibilidade do DNA espermático à denaturação (r=-0,52; p=0,0268).

Tabela 18 – Efeito da concentração de ácido decosa-hexanóico (DHA) associado as vitaminas C e E, combinadas ou não, nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009

	Controle	DHA (5 µM) + Vit. E (2 mM)	DHA (5 µM) + Vit. C (3 Mm)	DHA (5 µM) + Vit. E (2 mM) + Vit. C (3 mM)
MOTILIDADE (%)	18,61 ± 4,38	16,83 ± 7,19	15,17 ± 5,54	20,00 ± 1,64
VIGOR (%)	1,65 ± 0,24	1,75 ± 0,31	1,50 ± 0,18	1,64 ± 0,30
VIVOS (%)	29,42 ± 2,73[ab]	22,00± 2,12[b]	24,25 ± 2,50[ab]	34,14 ± 4,27[b]
ACROSSOMO (%)	70,87 ± 2,87	68,83 ± 1,92	73,92 ± 2,89	65,07 ± 6,80
DAB I (%)	64,00 ± 1,90[a]	49,83 ± 4,92[b]	61,87 ± 2,32[a]	67,08 ± 3,51[a]
DAB II (%)	21,09 ± 2,74[a]	28,00 ± 3,29[b]	24,87 ± 1,28[ab]	19,00 ± 2,51[a]
DABIII (%)	8,81 ± 0,84	12,93 ± 5,05	7,50 ± 0,54	9,64 ± 1,74
DAB IV (%)	6,09 ± 1,17	9,33 ± 2,17	5,75 ± 0,92	5,43 ± 0,10
DNA (%)	7,33 ± 1,38	7,26 ± 1,79	6,62 ± 0,95	8,01 ± 1,90
TBARS (ng/10^6 sptz)	394,41 ± 62,93	514,95 ± 44,94	429,80 ± 75,23	339,91 ± 17,86

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

Verificou-se que o tratamento com DHA e GSH apresentou maiores taxas de espermatozóides com membrana íntegra em comparação com o controle e a associação DHA/GPx/GSH (57,83 ± 5,51, 38,62 ± 7,15 e 22,42 ± 2,36%, respectivamente; Tabela 19). No entanto, tanto o tratamento com DHA e GSH como com a associação DHA/GPx/GSH apresentaram, em relação ao controle, células mais susceptíveis ao estresse oxidativo avaliado pelos níveis de TBARS (489,88 ± 66,83, 431,30 ± 42,74 e 247,12 ± 36,53 ng/10^6 espermatozóides, respectivamente; Tabela 19). Observou-se uma correlação negativa entre VIVOS e a porcentagem de células DAB IV ($r=-0,67$; $p=0,024$).

Tabela 19 – Efeito da concentração de ácido decosa-hexanóico (DHA) associado a antioxidantes glutationa reduzida (GHS) e glutationa peroxidase (GPx), combinados ou não, nas variáveis resposta motilidade, vigor, vivos, integridade acrossomal (ACROSSOMO), atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como índice de susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen coletado da cauda do epidídimo bovino e submetido à criopreservação - São Paulo - 2009

	Controle	DHA (5 µM) + GSH (5 mM)	DHA (5 µM) + GPx (5 UI/mL) + GSH (5 mM)
MOTILIDADE (%)	12,91 ± 3,26	13,33 ± 3,57	12,67 ± 4,88
VIGOR (%)	1,36 ± 0,15	1,42 ± 0,33	1,42 ± 0,20
VIVOS (%)	38,62 ± 7,15[a]	57,83 ± 5,51[b]	22,42 ± 2,36[c]
ACROSSOMO (%)	77,21 ± 2,07	79,08 ± 4,38	72,25 ± 1,53
DAB I (%)	56,35 ± 3,02	53,92 ± 2,37	55,00 ± 4,27
DAB II (%)	26,75 ± 1,88	27,67 ± 1,46	22,00 ± 2,22
DABIII (%)	10,45 ± 1,10	11,42 ± 0,92	9,17 ± 0,79
DAB IV (%)	6,45 ± 1,58	7,00 ± 1,28	10,50 ± 1,79
DNA (%)	4,79 ± 0,41[a]	4,96 ± 0,45[a]	6,56 ± 0,64[b]
TBARS (ng/10^6 sptz)	247,12 ± 36,53[a]	489,88 ± 66,83[b]	431,30 ± 42,74[b]

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

Discussão

7 DISCUSSÃO

A seção discussão foi dividida por experimentos, como foi feito nos resultados.

7.1 *Discussão - Experimento 1*

Os resultados encontrados no presente experimento mostram um efeito significativo da temperatura de estocagem do epidídimo por um período curto na porcentagem de espermatozóides com gota distal, assim como nos resultados subseqüentes à FIV. A temperatura de armazenamento não apresentou efeito sobre a resistência da célula espermática ao estresse oxidativo. Assim, amostras coletadas de epidídimos podem ser utilizadas com sucesso para a produção *in vitro* de embriões, sempre se levando em conta que a temperatura em que o epidídimo é armazenado é extremamente importante.

Apesar do grande número de estudos relacionados aos espermatozóides coletados de epidídimos em diversas espécies, poucos verificaram o efeito do armazenamento do epidídimo na fertilidade *in vitro*. Espermatozóides de ratos coletados de epidídimos armazenados a 5ºC apresentaram maior motilidade progressiva que espermatozóides coletados de epidídimos armazenados sob maiores temperaturas (SANKAI et al., 2001). Kaabi et al. (2003) compararam amostras coletadas de epidídimos ovinos estocados por 24 e 48 horas em temperatura ambiente e a 5ºC. Neste estudo, um efeito positivo significante da temperatura mais baixa foi encontrado na motilidade espermática e na porcentagem de espermatozóides morfologicamente normais. No entanto, a porcentagem de gotas citoplasmáticas (não categorizadas como anormais) não foi influenciado pela temperatura. Estes autores verificaram que amostras espermáticas coletadas de epidídimos armazenados a 4ºC apresentaram uma porcentagem de gotas citoplasmáticas duas vezes maior que os encontrados no presente experimento, sob as mesmas condições (4ºC). Perez-Garnelo et al. (2001), verificaram uma diminuição na porcentagem de gotas citoplasmáticas após o congelamento de sêmen epididimário de gazelas quando comparado com amostras pré-congelamento. Goovaerts et al. (2006) observaram porcentagens mais altas de gotas citoplasmáticas distais em amostras espermáticas epididimárias bovinas estocadas a 4ºC em

comparação com as encontradas no presente experimento sob as mesmas condições (47,26 vs. 23,75, respectivamente). No entanto, os espermatozóides foram coletados mais de 5 horas após o abate. Um aumento significativo nas gotas citoplasmáticas distais foi encontrado por Hori et al. (2005) em amostras espermáticas caninas coletadas de epidídimos armazenados por 24 horas a 5ºC, quando comparadas com amostras coletadas logo após a retirada do testículo (17,9 vs 4,7 % respectivamente). No estudo de Hori, a porcentagem média de gotas encontradas após 24 horas de armazenamento a 5ºC foi menor que as encontradas nos epidídimos armazenados a 4ºC no presente experimento (17,9 vs 30,7%, respectivamente). De acordo com estes autores, diferenças entre espécies, temperaturas de estocagem e o tempo entre a retirada do testículo e a coleta espermática são fatores determinantes que poderiam explicar os diferentes resultados encontrados na literatura. Além disso, Cooper e Yeung (2003) confirmaram que o manuseio da amostra (especialmente a osmolaridade dos diluentes utilizados) antes que a avaliação da quantidade de gotas citoplasmáticas seja acessada pode ter uma enorme influência sobre os resultados, podendo ser outro fator que pode ser responsável pelos resultados discrepantes encontrados nos estudos anteriores.

Apesar da maior ocorrência de gotas citoplasmáticas nos espermatozóides epididimários, principalmente localizados distalmente, ser considerada normal (KISHIKAWA et al., 1999; COOPER; YEUNG, 2003; GOOVAERTS et al., 2006), a diferença significante entre amostras coletadas de epidídimos estocados a 4 e a 34ºC encontrada no presente experimento não era esperada. Bartels (1999) encontraram uma tendência para um aumento na porcentagem de gotas distais em amostras espermáticas epididimárias bubalinas após 3 horas de estocagem do epidídimo a 6ºC. Esta diferença poderia ser explicada pela Lei de Van Hoff's (AHLQVIST, 2004), pela qual a pressão osmótica seria diretamente proporcional à temperatura. Assim, o aumento da temperatura levaria a um aumento na pressão osmótica. De acordo com Cooper e Yeung (2003), a osmolaridade é um dos fatores mais importante no desaparecimento das gotas citoplasmáticas. No entanto, o mecanismo pelo qual alterações da osmolaridade causariam uma diferença de gotas distais entre amostras coletadas de epidídimos armazenados a 4 e 34ºC não é conhecido. Outra hipótese para explicar a diferença na porcentagem de gotas entre as duas temperaturas de armazenamento, seria um possível efeito do choque frio, que induziria a perda de gotas citoplasmáticas distais em amostras coletadas de epidídimos armazenados a 4ºC. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Apesar de estudos anteriores relatarem a produção bem sucedida de animais vivos utilizando o sêmen de epidídimo em diferentes espécies, incluindo bovinos, existem poucos estudos na produção *in vitro* de embriões, sendo que todos utilizam amostras criopreservadas. Pelo conhecimento do autor, este é um dos primeiros estudos avaliando a produção *in vitro* de embriões utilizando amostras espermáticas epididimárias *in natura*. A taxa de blastocistos encontradas para o sêmen de epidídimo encontradas no presente esperimento foram semelhantes às encontradas por Katska et al. (1996) utilizando amostras epididimárias criopreservadas de bovinos (30,6% blastocistos). A taxa relativamente alta de blastocistos encontradas por estes autores pode ser explicada pela seleção das amostras espermáticas; apenas amostras com motilidade pós-descongelamento maior que 40% foram utilizadas para a FIV. Kaabi et al. (2003), verificaram a taxa de clivagem após a FIV de amostras espermáticas epididimárias criopreservadas em ovinos. As taxas de clivagem não foram influenciadas pela temperatura quando os epidídimos foram armazenados a 5ºC ou a temperatura ambiente por 24 e 48 horas. Este resultado é contrário ao encontrado no presente experimento no qual amostras espermáticas coletadas de epidídimos armazenados a 4ºC apresentaram maiores taxas de blastocisto do que as armazenadas a 34ºC. No entanto, visto que no presente experimento não foi avaliada a taxa de clivagem, uma importante fase do desenvolvimento embrionário não foi considerada no estudo de Kaabi. O efeito da temperatura na capacidade fecundante *in vitro* era esperado, visto que estudos anteriores observaram uma maior qualidade espermática em amostras coletadas de epidídimos armazenados a 4ºC quando comparada com a de amostras armazenadas a temperatura ambiente (FOOTE, 2000; HISHINUMA et al., 2003; KAABI et al., 2003). No entanto, a maioria dos experimentos que verificaram a capacidade fecundante das amostras epididimárias utiliza a congelabilidade como parâmetro qualitativo, fazendo comparações diretas complicadas.

Sabe-se que o estresse oxidativo é um fator deletério importante na diminuição da qualidade espermática e da fertilidade em diversas espécies incluindo a humana (AITKEN, 1999), a bovina (NICHI et al., 2006), a ovina (JONES; MANN, 1977) e em aves (BREQUE et al., 2003). No entanto, no presente estudo, apesar de uma maior porcentagem de gota citoplasmática distal, e da menor fertilidade *in vitro* nas amostras coletadas de epidídimos armazenados a 34ºC, não houve efeito da temperatura de armazenamento na susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo (TBARS). Assim, a hipótese de que o estresse oxidativo seria o maior responsável pela menor fertilidade das amostras coletadas de epidídimos armazenados a 34ºC não pode ser confirmada. No entanto, quando as amostras

foram armazenadas a 4ºC, os níveis de TBARS correlacionaram positivamente e negativamente com as gotas proximais e distais, respectivamente. Isto poderia indicar um possível papel protetor das gotas citoplasmáticas distais contra o ataque das espécies reativas de oxigênio, provavelmente por uma maior quantidade de antioxidantes citoplasmáticos no citoplasma residual de amostras coletadas de epidídimos armazenados a 4ºC. O papel das gotas citoplasmáticas no espermatozóide mamífero, seja ejaculado seja epididimária, ainda é controverso. Diversos experimentos com espermatozóide ejaculado humano verificaram uma correlação entre gotas citoplasmáticas, independente de sua localização, e a ocorrência do estresse oxidativo (FISHER et al., 2000; AZIZ et al., 2004; SAID et al., 2005b). Além disto, Thundathil et al. (2001) verificaram, na FIV com sêmen ejaculado bovino, uma correlação negativa entre as taxas de clivagem e a porcentagem de gotas proximais. Por outro lado, as gotas citoplasmáticas não exerceram influência sobre a motilidade ou viabilidade em sêmen ejaculado de humanos (COOPER et al., 2004), sugerindo que esta anomalia não seria deletéria. De acordo com Cassani et al. (2005), uma maior quantidade de espermatozóides contendo gotas citoplasmáticas pode levar a uma maior quantidade de superóxido dismutase, um antioxidante enzimático que estaria presente no citoplasma residual. Estudando sêmen de epidídimo, Barth e Oko (1989) sugeriram que as gotas citoplasmáticas seriam resíduos de citoplasma com importância funcional. Cooper e Yeung (2003) discutem a função das gotas citoplasmáticas no epidídimo na resposta regulatório do volume, protegendo o espermatozóide contra o choque osmótico que ocorreria no momento da ejaculação, quando células espermáticas entram em contato com a menor osmolaridade do plasma seminal. Assim, a ausência de diferenças nos níveis de TBARS entre testículos armazenados a 4 e a 34ºC poderia ser explicada pela função protetora das gotas distais, encontradas em maior número nas amostras estocadas em altas temperaturas. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Os resultados do presente experimento sugerem que altas taxas de blastocisto podem ser obtidas *in vitro* após a fecundação com amostras espermáticas provenientes de epidídimo. Além disto, o armazenamento a 4ºC permitiu maior qualidade espermática e maior capacidade fecundante *in vitro* que as armazenadas sob temperaturas fisiológicas (34ºC). Aparentemente, este efeito não foi causado diretamente pelo estresse oxidativo. No entanto, o maior número de gotas citoplasmáticas distais podem ter aumentado a capacidade antioxidante das amostras provenientes de testículos armazenados a 34ºC sem, no entanto, melhorarem a qualidade

destas amostras. Provavelmente, esta capacidade antioxidante das gotas distais seria uma das funções destas alterações morfológicas comuns nos espermatozóides epididimários.

7.2 *Discussão - Experimento 2*

Os resultados encontrados no presente experimento mostraram um efeito significante do armazenamento a curto prazo de epidídimos nas variáveis motilidade e na viabilidade e atividade mitocondrial dos espermatozóides epididimários, sendo que os resultados mostraram uma diminuição na qualidade espermática em amostras coletadas de epidídimos armazenados a 34ºC. No entanto, após a criopreservação e a descongelação, não houve diferença para algumas variáveis (i.e., MOT, PROG, RAPID) na comparação entre epidídimos armazenados a 4 ou a 34ºC, indicando que a queda na qualidade espermática após a criopreservação foi mais evidente nas amostras provenientes de epidídimos armazenados a 4ºC. Para a integridade de membrana e para a atividade mitocondrial, a armazenagem a 34ºC foi deletéria. No entanto, a baixa qualidade das amostras provenientes de epidídimos armazenados a 34ºC pode ter influenciado estes resultados. As correlações encontradas entre a integridade de membrana e a atividade mitocondrial com as variáveis do CASA indicam que a diminuição da motilidade nas amostras coletadas de epidídimos armazenados a 34ºC pode estar relacionado a uma diminuição da atividade mitocondrial e não a danos da membrana visto que estas correlações foram observadas em amostras com baixa atividade mitocondrial, mas com membrana íntegra. No entanto, para amostras provenientes de epidídimos armazenados a 34ºC e analisadas após a criopreservação, as correlações (positiva entre IM/HMP e MOT; negativa entre DM/LMP e MOT) indicaram que a diminuição da fertilidade pode estar relacionada a danos na membrana espermática.

A literatura relacionada à análise de espermatozóides coletadas de epidídimos bovinos e avaliados por análise computadorizada é limitada. Goovaerts et al. (2006) coletaram amostras espermáticas de epidídimos bovinos e armazenaram a 4ºC até 5 horas após o abate e submeteram estas amostras à análise computadorizada de motilidade (CASA). Os valores de motilidade descritos neste estudo são comparáveis aos encontrados no presente experimento em amostras coletadas de epidídimos armazenados por até 3 horas, também a 4ºC, antes da criopreservação. Martínez-Pastor et al. (2006) relataram resultados semelhantes de MOT e

PROG, valores mais baixos para VAP e valores mais altos para LIN em epidídimos de cervos vermelhos ibéricos armazenados a 5ºC, em comparação aos encontrados no presente experimento para amostras provenientes de epidídimos armazenados a 4ºC. Por outro lado, após a criopreservação, as variáveis MOT e PROG foram maiores que as encontradas no presente experimento. Neste trabalho, no entanto, os autores pré selecionaram as amostras (motilidade mínima de 50%), para proceder a criopreservação.

No presente experimento houve uma queda marcante na motilidade pós-descongelação em amostras coletadas de epidídimos armazenados a 4ºC (Pré=59,62 ± 3,14 % vs. Pós= 16,21 ± 4,36 %, $p < 0.05$). Este resultado pode sugerir que os diluidores comerciais desenvolvidos para sêmen ejaculado bovino pode não ser ideal para a utilização em amostras espermáticas epididimárias. Escassos são os trabalhos disponíveis sobre a adequação de diluidores rotineiramente utilizados para a criopreservação de amostras epididimárias em touros. Herold et al. (2003) compararam a sobrevivência de espermatozóides coletados de epidídimos de touros e crioprervados em Andromed® ou Triladyl™, não havendo resultados conclusivos sobre qual o melhor diluidor, nem sobre o benefício da adição de plasma seminal no processo de criopreservação. Mais estudos foram realizados em ruminantes selvagens, no qual amostras espermáticas epididimárias apresentaram maior motilidade após a criopreservação com Biladyl® em comparação ao Triladyl™ (BARTELS et al., 1999; KILLIAN et al., 2000). No entanto, em búfalos africanos, a motilidade pós-descongelação mostrou-se melhor com a utilização do Triladyl™ em comparação com o Andromed®, sendo que a adição de 10% de plasma seminal foi deletéria, indicando que a extrapolação dos dados encontrados em ruminantes selvagens para bovinos deve ser feita com cautela.

Os resultados encontrados no presente experimento para a coloração tripla indicam que tanto a temperatura de armazenamento do epidídimo como a criopreservação afetam negativamente a viabilidade espermática e a atividade mitocondrial. De Pauw et al. (2003) verificaram o efeito de condições epididimárias simuladas no sêmen ejaculado de bovinos utilizando a coloração tripla (SYBR-PI e JC-1). Estes autores observaram que após um período de 72 horas de armazenamento em temperatura ambiente, os valores de motilidade caíram para zero, enquanto que a integridade de membrana e a atividade mitocondrial permaneceram inalteradas, indicando estas variáveis podem não ser a razão principal para a perda de motilidade. No entanto, no presente experimento, os valores de motilidade, potencial de membrana mitocondrial e integridade de membrana se comportaram de maneira semelhante nos diferentes tratamentos. Além disso, estas variáveis estavam bastante

correlacionadas. Assim, mais estudos são necessários para confirmar a real causa da perda de motilidade em espermatozóides coletadas de epidídimos após um longo período de armazenagem.

As correlações encontradas para as amostras antes do congelamento indicaram que o efeito negativo da temperatura de 34ºC na motilidade pode ter ocorrido devido a diminuição da atividade mitocondrial, visto que variáveis indicando uma baixa motilidade correlacionaram-se com uma baixa atividade mitocondrial e não com danos de membrana, principalmente para amostras proveniente de testículos armazenados a 34ºC. Isto pode ter ocorrido devido ao aumento de alterações *post-mortem* devido as altas temperaturas levando a danos de mitocôndria que, por sua vez, levariam à liberação de fatores pró-oxidativos e pró-apoptóticos (KOPPERS et al., 2008). Por outro lado, danos à membrana plasmática causados pelo processo de criopreservação podem ser a razão principal para os baixos índices de motilidade após a congelação, como indicado pelas correlações, especialmente em amostras coletadas de epidídimos armazenados a 4ºC. Além disso, em amostras espermáticas de humanos, correlações entre motilidade, atividade mitocondrial e integridade de membrana também foram observados (EVENSON et al., 1982; AUGER et al., 1989). Estes resultados sugerem que a atividade mitocondrial comprometida de amostras coletadas de epidídimos armazenados a 34ºC podem ter levado a uma maior susceptibilidade do espermatozóide aos danos causados pelo processo de criopreservação. Uma das razões que pode explicar este fato seria o ataque das espécies reativas de oxigênio (ROS). Diversos estudos em humanos demonstraram que baixa atividade mitocondrial está relacionada a uma maior produção de ROS (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1992; GIL-GUZMAN et al., 2001; WANG et al., 2003). Estudos conduzidos por nosso grupo confirmaram esta hipótese para espermatozóides bovinos epididimários (dados não publicados).

7.3 *Discussão - Experimento 3*

A cauda do epidídimo tem se mostrado uma fonte de espermatozóides viáveis capazes de fecundação, resultando no nascimento de indivíduos normais. Após a morte de um animal, os espermatozóides nos machos, e os oócitos nas fêmeas, permanecem viáveis por um período de tempo. Se os gametas forem recuperados e utilizados para a produção de embriões por

técnicas de reprodução assistida, é possível então, gerar uma progênie mesmo após a morte de um animal (SONGSASEN; TONG; LEIBO, 1998). No entanto, para que esta técnica seja viável é necessário que alguns parâmetros sejam definidos, tais como, as condições de armazenamento do testículo pós coleta, a forma de coleta da amostra espermática e a criopreservação. Esta última permite a utilização do sêmen por tempo indefinido, facilitando a logística da biotécnica reprodutiva a ser emprega. No caso da inseminação artificial, da inseminação artificial em tempo fixo, da FIV e da ICSI este passo é imprescindível. No entanto, os resultados de criopreservação deste material têm gerado resultados variáveis. No presente experimento, taxas razoáveis de blastocistos foram obtidas utilizando amostras espermáticas epididimárias criopreservadas obtidas de testículos armazenados a 4ºC por até 4 horas.

Apesar da fecundação *in vitro* ser bastante utilizada e estudada em bovinos, estudos empregando esta técnica para a avaliação da qualidade espermática de amostras coletadas do epidídimo bovino são bastante escassos. Martins et al. (2009), mantiveram testículos bovinos por 24, 48 e 72 horas a 5ºC. Neste experimento os autores obtiveram taxas de blastocistos semelhantes as encontradas no presente experimento para amostras armazenadas a 34ºC (13,4 e 13,57%, respectivamente). Evidentemente, a comparação é complicada visto que as condições são bastante diferentes. No presente estudo as amostras foram armazenadas por até 4 horas após o abate. No entanto, no experimento de Martins, não houve diferença na taxa de blastocistos quando testículos foram coletados após 48 ou 72 horas (6,28 e 8,27%, respectivamente). De acordo com Fernández-Santos et al. (2009), o epidídimo possui condições adequadas para prolongar a sobrevivência do espermatozóide, pois a cauda fornece um ambiente ideal para o armazenamento dos gametas em condições fisiológicas.

Não foram observadas diferenças nas amostras provenientes de testículos armazenados a 4 ou a 34ºC em relação à susceptibilidade ao estresse oxidativo (TBARS). Esperava-se que as amostras armazenadas em temperaturas mais elevadas apresentassem uma maior susceptibilidade ao ataque das ROS, visto que o metabolismo estaria aumentado. Uma hipótese para explicar estes dados seria pela autólise. A diminuição da qualidade espermática dos testículos armazenados a 34º C pode ter ocorrido por este mecanismo. No entanto, em estudo realizado por Songsasen et al. (1998), ratos eutanasiados foram mantidos a temperatura ambiente por 24 horas antes que fosse realizada a remoção dos testículos e a extração dos espermatozóides. Neste estudo, os espermatozóides epididimários foram usados com sucesso para a geração de uma prole viável utilizando a FIV com posterior transferência dos embriões.

Segundo Hafez e Hafez (2000), o epidídimo é um órgão completamente separado do testículo, sendo este também um órgão bastante particular devido à barreira hemato testicular. Assim, pode-se inferir que o sêmen armazenado na cauda do epidídimo esta bastante protegido em relação aos outros órgãos. Outro fator a ser levado em consideração é que a ausência de diferenças na susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo, não indicaria que o estresse oxidativo não estaria ocorrendo e levando a danos às diferentes estruturas espermáticas. A técnica de TBARS visa avaliar apenas o ataque das ROS a lipídeos. Caso os danos ocorram em proteínas, carboidratos ou mesmo no material genético, esta técnica pode não ser eficiente. Assim, mais estudos são necessários para avaliar o efeito da autólise no sêmen armazenado no epidídimo após a morte do animal, assim como na lesão oxidativa a outros sistemas biológicos.

Apesar da ausência de diferenças na susceptibilidade das amostras ao estresse oxidativo (TBARS), verificou-se um efeito desta variável na taxa de blastocistos Nas amostras coletadas de testículos armazenados a 4ºC, observou-se uma correlação negativa entre TBARS e a produção de embriões, isto é, quando mais susceptível for uma amostra ao ataque das espécies reativas de oxigênio, mais embriões são formados. Por outro lado, nas amostras coletadas de epidídimos armazenados a 34ºC, observou-se o contrário, isto é, quanto mais susceptível ao ataque das ROS for uma amostra, maior é a taxa de blastocisto, assim como mais rapidamente ocorre o desenvolvimento embrionário. Tal fato poderia ser explicado por papel patológico das espécies reativas nas amostras coletadas de testículos armazenados a 4ºC e por um papel fisiológico destas substâncias nas amostras coletadas de testículos armazenados a 34ºC. Aparentemente, estes resultados contrariam as expectativas, visto que, por apresentarem maiores taxas de blastocistos, esperava-se que as ROS apresentassem um papel fisiológico nas amostras provenientes de testículos armazenadas a 4ºC. No entanto, é importante notar que os níveis de TBARS não indicam níveis reais de espécies reativas de oxigênio. Esta técnica se baseia no desafio das amostras à condições com concentração de ROS significativamente mais altas que as encontradas em qualquer momento, seja ele fisiológico ou patológico. Assim, o fato de uma amostra espermática ser mais susceptível ao estresse oxidativo pode indicar, por exemplo, uma quantidade maior de ácidos graxos poli-insaturados na membrana espermática. Isto poderia tornar as células mais susceptíveis ao estresse oxidativo, mas poderia levar a uma melhora na fluidez da membrana ou a uma maior resistência ao choque térmico, o que seria extremamente benéfico. Estudos que durante o trânsito epididimal a aquisição da competência functional é acompanhada de um

remodelamento da membrane plasmática que envolve a depleção seletiva de fosfolípides, uma perda na concentração de PUFA e um aumento na razão esterol/fosfolípide (JONES, 1998). Assim, as células, mesmo que na cauda do epidídimo ainda estão bastante susceptíveis às mudanças no ambiente. Assim, as diferentes temperaturas de armazenamento podem ter alterado o perfil lipidico das células.

As correlações positivas encontradas entre a taxa de blastocistos em diferentes fases de desenvolvimento com a porcentagem de células com membrana íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial e com a porcentagem de células com membrana íntegra e baixo potencial de membrana mitocondrial pode indicar que a integridade da membrana espermática é de extrema importância para a fertilidade *in vitro* das amostras espermáticas coletadas de testículos armazenados tanto a 4ºC. Por outro lado, nas amostras coletadas de testículos armazenados a 34ºC, foram encontradas correlações entre taxas de blastocistos em diferentes fases do desenvolvimento com as células com membrana íntegra e alto potencial de membrana mitocondrial (correlação positiva) e com as células com membrana lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial (correlação negativa). Este resultados sugerem que, neste caso, a atividade mitocondrial parece ser mais importante para a fertilidade *in vitro* destas amostras.

Pouco se sabe ainda da correlação entre as variáveis avaliadas pelo CASA com a fertilidade. No presente experimento, as variáveis que melhor correlacionaram com a taxa de blastocistos foi o BCF (positivamente), a porcentagem de células estáticas (negativamente) e a porcentagem de células com movimento médio (negativamente e positivamente para amostras coletadas de testículos armazenados a 4 e 34ºC, respectivamente). Mais estudos são necessários para avaliar a correlação entre as variáveis avaliadas pelo CASA e a fertilidade, sem as vieses encontrados no presente experimento.

7.4 *Discussão - Experimento 4*

Da mesma forma que os resultados, a discussão do experimento 4 será divida em três sub-seções.

7.4.1 Efeitos dos antioxidantes enzimáticos

O tratamento com os antioxidantes enzimáticos apresentou resultados bastante diversos. Enquanto a catalase apresentou os piores resultados para a maioria das variáveis, verificou-se que a superoxido dismutase foi eficiente na melhora da atividade mitocondrial, integridade da membrana e do acrossomo e susceptibilidade das células espermáticas ao estress oxidativo (TBARS). Assim, optou-se por não utilizar a catalase na seqüência do experimento. O efeito adverso da catalase não era esperado. Uma hipótese para explicar este resultado seria a inibição de processos fisiológicos por uma possível dose excessiva de antioxidante. Como dito anteriormente, as espécies reativas de oxigênio possuem um papel fisiológico em diversos mecanismos da célula espermática. Doses excessivas de antioxidantes poderiam inibir estes processos. Além disto, estudos anteriores não encontraram a presença de catalase no sêmen de touros (NICHI et al., 2006). Assim, o tratamento com catalase, principalmente em altas concentrações, seria completamente diferente do meio no qual os espermatozóides bovinos estariam preparados e adaptados a enfrentar.

As superóxido dismutases foram as primeiras enzimas metabolizantes de ROS a serem descobertas (ALVAREZ et al., 1987). Na reação catalisada pelas SODs, duas moléculas de ânion superóxido (O_2-) formam uma molécula de O_2 e uma de H_2O_2, esta última destruída posteriormente pela catalase ou pelo sistema glutationa peroxidase. Segundo Matés (2000), as SODs, em humanos, são classificadas em 3 tipos: superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), superóxido dismutase do citosol (CuZn-SOD) e a SOD extracelular (EC-SOD).

Em experimento realizado por Alvarez et al. (1987), altas correlações foram encontradas entre a atividade da superóxido dismutase com o índice de peroxidação lipídica espontânea ($r=-0,97$, $p<0,05$) e com o tempo de perda de motilidade ($r=0,87$, $p<0,05$), em amostras de sêmen humano, indicando ser a SOD, o principal mecanismo de proteção contra a peroxidação lipídica em humanos. No presente experimento, observou-se que o tratamento com SOD provocou uma maior resistência ao estresse oxidativo e uma melhora na atividade mitocondrial. No entanto, é importante frisar que os níveis de TBARS avaliados no estudo de Alvarez e os encontrados no presente experimento são diferentes, sendo que neste último os níveis de TBARS foram avaliados após um desafio com vitamina C e Ferro, sistema gerador de radical hidroxila (OH-).

Por outro lado, Aitken et al. (1996) verificaram que altos níveis de SOD estavam associados à função espermática defeituosa devido à alta susceptibilidade das células espermáticas aos efeitos citotóxidos do H_2O_2. Isto ocorre pois a SOD, ao catalisar a dismutase do ânion superóxido, leva à produção de H_2O_2 o que, na ausência de mecanismos de destruição (e.g., catalase ou glutationa peroxidase), pode ser potencialmente danoso. No entanto, no presente estudo, quando associou-se a SOD à GPx, não foram encontrados efeitos significantes, indicando que o ânion superóxido em si pode ser bastante lesivo. Outra hipótese seria que a GPx, pela falta de GSH, não apresentaria o efeito desejado, visto que, para que a GPx catalise a destruição do peróxido de hidrogênio seria necessária a presença de GSH como substrato.

Griveau e Le Lannou (1994), verificaram que as adições de SOD e GPx em amostras espermáticas humanas evitaram a perda de motilidade após 24 horas de incubação. A adição de SOD melhorou as taxas de hiperativação e reação acrossômica, o que não ocorreu com a adição de glutationa peroxidase e catalase. No entanto, no presente experimento, quando foi realizada a combinação entre SOD e GPx, não foram encontrados efeitos significantes em nenhuma das variáveis estudadas. Em um sistema de produção de ROS proposto por Twigg et al. (1998), a adição de NADPH, provável indutor de produção de ROS intracelular, provocou altos níveis de peroxidação lipídica e danos na motilidade e no DNA espermático. Neste experimento, a adição de SOD e catalase não foi eficaz na prevenção dos efeitos adversos das ROS. Segundo o autor, isso ocorreu provavelmente devido à indução da formação de ROS na interior da célula, indicando que os níveis de proteção antioxidante dependem dos locais de produção destes radicais e conseqüente peroxidação lipídica. A ausência de efeitos da combinação utilizada no presente experimento pode ter sido causada pelos diferentes sítios de ação destes antioxidantes. Além disto, a absorção destas enzimas pelos diferentes compartimentos das células espermáticas pode ocorrer de forma diferenciada também.

7.4.2 Efeitos dos antioxidantes não-enzimáticos

Apesar da ausência de efeitos do tratamento com GSH nas amostras espermáticas epididimárias criopreservadas, foram observadas correlações entre a susceptibilidade do DNA espermáticos à denaturação (DNA) e as variáveis avaliadas pela coloração diaminobenzidina

(i.e., atividade mitocondrial). Estes resultados sugerem que a fragmentação do DNA pode ter sido causada pela liberação de fatores pró oxidativos causada pela denaturação ácida, que por sua vez, levou a danos de mitocôndria. As correlações, negativas com DAB III e IV e positiva com DAB I, podem indicar que a presença de células com baixa atividade mitocondrial, por já se apresentarem lesadas, não contribuíram para a fragmentação do DNA. Já as amostras apresentando uma alta porcentagem de espermatozóides com alta atividade mitocondrial, ao serem submetidas ao desafio ácido, seriam capazes de liberar altas concentrações de fatores pró-oxidativos e pró-apoptóticos, levando a lesões severas de DNA, detectadas então pelo laranja de acridina. O fato de não serem observadas correlações entre o TBARS e a susceptibilidade do DNA espermático à denaturação pode ter ocorrido pois os TBARS avaliam a o ataque das ROS aos lipídeos, sendo que caso o estresse oxidativo ocorra no material genético, esta técnica pode não ser eficiente.

O GSH é considerado por alguns autores como o mais importante antioxidante celular (ANDERSON, 1998; WU et al., 2004). A principal atividade desta substância como antioxidante é a destruição do peróxido de oxigênio através de reação enzimática, tendo como catalisador a glutationa peroxidase. Nesta reação, o GSH é oxidado para a formação da gluationa oxidada (GSSG), que por sua vez é então reduzida para sua forma original através da enzima NADPH-dependente glutationa redutase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). No entanto, no presente estudo não foram encontrados efeitos significantes do GSH. Uma hipótese para explicar estes resultados seria a quantidade de GSH utilizada. Sabe-se que a produção de ROS por espermatozóides é um processo fisiológico normal, sendo importante para a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência da reação acrossômica e para a fusão espermatozóide / oócito (AITKEN et al., 1991; GAGNON, 1993; GRIVEAU et al., 1994; KODAMA et al., 1996; DE LAMIRANDE et al., 1997; DE LAMIRANDE; SENGOKU et al., 1998). Assim, a presença de uma quantidade moderada de espécies reativas de oxigênio é necessária. Desta forma, o tratamento com antioxidantes em quantidade excessiva pode levar a efeitos deletérios a estes eventos fisiológicos, como observado em experimentos com a suplementação oral com vitaminas E e C, β-caroteno e selênio (HERBERT, 2007; SEIFRIEDA et al., 2007).

O tratamento com vitamina C apresentou efeitos significantes para a mitocôndria, com a diminuição da porcentagem de células com ausência de atividade mitocondrial. As correlações encontradas entre a integridade de membrana e a porcentagem de células DAB III (negativa) e entre esta e a susceptibilidade dos espermatozódes ao estresse oxidativo

(TBARS) indica que um dos mecasnismos responsáveis por danos oxidativos e danos de membrana envolveria a mitocondria. A vitamina C é um antioxidante solúvel em água, podendo ser encontrado facilmente absorvido, mas não é estocado nos sistemas biológicos. O mecanismo de ação antioxidante da Vitamina C ocorre através de sua capacidade redutora como doador de eletron. A Vitamina C é chamada de antioxidante, pois ao doar seus eletrons, ela previne que outros compostos sejam oxidados. No entanto, a Vitamina C, ao ser oxidada, leva a formação do radical ascorbil que, no entanto, é relativamente estável. Assim, ao ser oxidada pelas ROS, a Vitamina C leva a formação de um radical menos reativo (BIELSKI; RICHTER; CHAN, 1975). Um outro importante mecanismo de ação da Vitamina C é na recuperação da Vitamina E (alfa tocoferol). Na reação antioxidante da Vitamina E com uma ROS, ocorre a formação do radical alpha tocoferoxil. Esta radical, por sua vez, pode ser reduzido pelo ascorbato de volta para a forma de alfa tocoferol (NEUZIL; THOMAS; STOCKER, 1997). Esta, na realidade, foi a principal razão da constituição do grupo tratado com a associação entre as Vitaminas C e E.

Por sua vez, a vitamina E atua na membrana plasmática como um antioxidante lipo-solúvel, prevenindo a reação oxidativa em cadeia (MATÈS, 2000). Pela natureza lipídica, a vitamina E penetra em membranas biológicas, sendo considerada uma linha única de defesa antioxidante visto que não necessita estar associada a nenhuma outra substância para terminar com a reação de oxidação em cadeia (CHOW, 1989; FARISS, 1991). Seu principal mecanismo de ação é através da destruição do radical hidroxila (BJÖRNEBOE; BJÖRNEBOE; DREVON, 1990). No presente estudo, a Vitamina E foi eficiente no aumento da resistência dos espermatozóides ao estresse oxidativo, principalmente nas amostras tratadas com 2,5 mM. No entanto, este efeito protetor não se refletiu nas outras variáveis estudadas, sendo que houve até mesmo uma piora na motilidade espermática nas amostras tratadas com 0,5 e 1,5 mM. Apesar disto, as amostras tratadas com Vitamina E, apresentaram 10% a mais de espermatozóides com alta atividade mitocondrial quando comparadas com o controle, sem que, no entanto, fosse verificada significância estatística. Este resultado seria esperado visto que estudos sugerem que a vitamina E esta presente em todas as membranas celulares, incluindo as membranas das organelas como a mitocôndria, na qual esta presente na membrana mitocondrial interna ligada a complexos protéicos (ERNSTER; FOSMARK; NORDENBRAND, 1992).

Nas foi observado efeito do tratamento com a combinação entre as vitaminas C e E. Um aspecto importante a ser levado em consideração em uma terapia antioxidante seria o tipo

de antioxidante a ser utilizado. A formação e destruição das ROS é uma reação em cadeia em que cada um dos antioxidantes, em seqüência, elimina as ROS formadas. Assim, caso o antioxidante utilizado no tratamento não seja o responsável pela destruição da ROS mais deletéria em um determinado momento, este tratamento não apresentará os efeitos desejados. A escolha do antioxidante utilizado também é importante em relação ao seu local de ação. Antioxidantes diferentes apresentam atuação mais destacada em determinados compartimentos específicos da célula. Assim, caso os danos causados pelo estresse oxidativo não envolverem este determinado compartimento, o tratamento antioxidante não será eficiente. Isto pode ter ocorrido no caso do tratamento com a combinação entre as Vitaminas C e E. Por atuarem em regiões diferentes das células (i.e., a Vitamina E atua na membrana lipidica e a Vitamina C, na fase aquosa), a interação entre as duas Vitaminas pode não ter sido eficiente.

7.4.3 Efeito do Ácido Decosa-hexanóico (DHA) e antioxidantes

O tratamento com DHA apresentou um efeito benéfico para a motilidade espermática. No entanto, como esperado, houve um aumento na susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo (TBARS), num comportamento dose dependente. Pelas correlações encontradas pode-se constatar a importância da mitocôndria para a integridade das membranas plasmática e acrossomal, sendo que amostras com alta atividade mitocondrial apresentavam maiores porcentagens de espermatozóides com membrana e acrossomo íntegros. Em estudo conduzido por Aitken et al. (2006), amostras de sêmen humanas foram incubadas com diferentes concentrações de DHA, a saber, 7,2, 14,4, 28,8, 57,6 e 115,2 μM. Estes pesquisadores verificaram que a partir de 7,2 μM houve um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio em relação ao controle, sem que houvesse um efeito significante na viabilidade espermática. O aumento da na produção de ROS foi dose dependente, sendo que apenas na concentração máxima (115,2 μM) o DHA apresentou um efeito citotóxico, diminuindo bastante a viabilidade espermática. No presente experimento optou-se por utilizar doses abaixo de 10 μM para evitar o efeito indutor da produção de ROS observado no tratamento com DHA.

Na avaliação do efeito do tratamento com DHA associado a SOD e GPx observou-se que as amostras tratadas com SOD e DHA apresentaram uma maior motilidade em relação ao controle. Comparando com os resultados encontrados com o tratamento apenas com a SOD, podemos verificar que o efeito positivo encontrado neste caso para a atividade mitocondrial não foi observado nas amostras tratadas também com DHA. Provavelmente para que houvesse um aumento na motilidade espermática a SOD disponível foi mobilizada para a proteção de regiões que se tornaram mais susceptíveis ao estresse oxidativo pela incorporação do DHA, o que, provavelmente, não ocorreu com a mitocôndria. Visto que a SOD foi a enzima que apresentou os melhores resultados na melhora da qualidade espermática, pode se inferir que o ânion superóxido possui papel importante na diminuição da qualidade espermática de amostras coletadas do epidídimo e submetidas à criopreservação. Isto ocorre pois a SOD é o principal sistema de defesa contra esta ROS. Said et al. (2004) verificaram que homens inférteis apresentaram maiores níveis de ânion superóxido, sendo que, nestes casos, houve uma correlação negativa entre a produção desta ROS e a motilidade espermática.

Mais uma vez, a Vitamina E não apresentou resultados favoráveis, desta vez em associação com o DHA. Da mesma forma, a associação entre as Vitaminas C e E não apresentou os resultados esperados. Apenas para a porcentagem de células com membrana íntegra verificou-se um efeito positivo, principalmente em relação às amostras tratadas apenas com a Vitamina E.

Já a associação entre DHA e GSH apresentou resultados favoráveis em relação à porcentagem de espermatozóides com membrana íntegra, tanto em relação ao controle como em relação às amostras tratadas com DHA associado ao GPx e ao GSH. Esta última combinação foi utilizada, pois como dito anteriormente, a atuação da GPx é dependente da presença do GSH como substrato para a destruição do peróxido de hidrogênio. Assim, teoricamente, o tratamento com apenas um seria limitado pela presença do outro na amostra. Por outro lado, nem o DHA associado ao GSH e nem a associação entre DHA, GPx e SOD foram capazes de diminuir a susceptibilidade das células ao estresse oxidativo, visto que os TBARS foram significativamente maiores em relação ao controle.

Sabe-se que, para que um tratamento antioxidante seja eficiente é necessário que o sistema biológico estudado esteja submetido a concentrações de ROS suficientes para sobrepujar o seu mecanismo de defesa antioxidante. Um tratamento antioxidante, mesmo em concentrações reduzidas pode também ser deletério. Por outro lado, para amostras que apresentem estresse oxidativo, isto é, um desbalanço entre uma maior produção de ROS e

uma menor atividade antioxidante, quantidades insuficientes de antioxidante em uma suplementação não apresentariam os efeitos desejados. Assim, o tratamento com diferentes concentrações de antioxidantes visando identificar a concentração ideal é imprescindível. A ausência de efeitos significativos do tratamento antioxidante, para algumas variáveis avaliadas no presente experimento, pode ter ocorrido pela suplementação com níveis insuficientes ou excessivos.

Outro aspecto a ser levado em consideração em uma terapia visando evitar os efeitos lesivos das ROS, seria o antioxidante a ser utilizado. A formação e destruição das ROS é uma reação em cadeia em que cada um dos antioxidantes, em seqüência, elimina as ROS formadas. Assim, caso o antioxidante utilizado no tratamento não seja o responsável pela destruição da ROS mais deletéria em um determinado momento, este tratamento não apresentará os efeitos desejados. Além disso, como visto anteriormente, na escolha do antioxidante utilizado, é importante avaliar seu local de ação. Os diferentes antioxidantes apresentam atuação mais destacada em determinados compartimentos específicos da célula. Assim, caso os danos causados pelo estresse oxidativo não envolverem este determinado compartimento, o tratamento antioxidante não será eficiente.

.

7.5 *Considerações finais*

No presente experimento, verificou-se que, para o armazenamento do testículo e posterior coleta do sêmen a partir da cauda do epidídimo e seu aproveitamento para utilização em biotécnicas reprodutivas, seria imperioso mantê-lo à 4ºC o mais rápido possível. Assim, com a morte de um animal de alto valor genético, ou de um animal em risco de extinção, o procedimento indicado seria retirar os testículos e armazená-los em geladeira comum, caso não seja possível que a coleta seja realizada imediatamente. Da mesma forma, ao retirar amostras de abatedouro para a utilização em pesquisa, é necessário que o armazenamento e transporte do material seja realizado em temperaturas baixas, sendo que uma caixa térmica com gelo apresentaria resultados satisfatórios.

Uma importante justificativa para a utilização de amostras coletadas da cauda do epidídimo é em relação à fisiologia de um ambiente no qual o espermatozóide, já maduro, permanece viável por longos períodos. Um exemplo deste estudo foi o interessante resultado

encontrado no presente experimento em relação ao papel das gotas citoplasmáticas no sêmen do epidídimo. Sabe-se que no epidídimo a presença de gotas ocorre fisiologicamente em altas quantidades. Verificou-se que a porcentagem de gotas citoplasmáticas proximais correlacionou-se positivamente com a susceptibilidade das células ao estresse oxidativo. Isto indicaria que o aumento na quantidade destas gotas aumentaria a susceptibilidade das células espermáticas epididimárias ao estresse oxidativo. Por outro lado, as gotas citoplasmáticas distais correlacionaram-se negativamente com a susceptibilidade das células ao estresse oxidativo. Tal resultado indicaria que as gotas, quando localizadas distalmente, apresentariam um papel antioxidante na cauda do epidídimo, sendo esta umas das funções da alta concentração destas gotas encontradas fisiologicamente nesta região.

A utilização do sêmen coletado do epidídimo pode também ser utilizada para a avaliação da eficiência de meios diluidores, tanto para a utilização para o próprio sêmen epididimário, como para o sêmen ejaculado. Evidentemente, estudos são necessários para que para que esta inferência seja eficaz. No presente estudo, foi utilizado o sêmen coletado da cauda do epidídimo para o estudo da suplementação do meio diluidor para criopreservação do sêmen com ácido decosaexanóico, importante ácido graxo poli-insaturado para o espermatozóide, associado ao tratamento antioxidante. Os resultados encontrados indicam que o tratamento com ácido decosaexanóico associado à superóxido dismutase (SOD) ou à glutationa reduzida (GSH) tem o potencial de melhora de algumas características importantes do sêmen pós descongelação. Uma das conclusões prováveis é que o sêmen do bovino seria particularmente susceptível ao ataque do ânion superóxido. Por outro lado, vários antioxidantes não apresentaram o efeito desejado. A eficiência de uma tratamento com antioxidante depende de uma série de fatores tais como:

1- A presença de um estresse oxidativo suficiente para sobrepujar os mecanismos antioxidantes do meio, isto é, o tratamento de amostras que não estejam sofrendo estresse oxidativo pode não surtir o efeito desejado.

2- O local e o momento de ação do antioxidante deve ser o mesmo da ROS que esteja causando os danos.

3- A concentração do antioxidante utilizado é de extrema importância. Se por um lado, o tratamento com concentrações abaixo das necessárias seria insuficiente, o tratamento com concentrações altas pode ser deletério, visto que as ROS possuem um ao papel fisiológico em importantes processos. Assim, o tratamento antioxidante em concentrações excessivas pode

ser levar ao bloqueio de importantes funções fisiológicas da célula. Assim, é necessário que sejam avaliadas diferentes concentrações de antioxidante.

4- A cadeia de formação e destruição das ROS. Deve se levar em conta que o estresse oxidativo é uma reação em cadeia. Assim, o tratamento com uma ROS poderia levar a formação de outras. Por exemplo, em uma amostra extremamente susceptível ao peróxido de hidrogênio, o tratamento com SOD poderá ser extremamente prejudicial visto que a mesma provoca a destruição do ânion superóxido com a formação do peróxido de hidrogênio. Assim, potencialmente, este tratamento teria um efeito pró-oxidativo.

5- A qual ROS estaria levando a danos. Os anntioxidante, em geral, tem uma ação específica. Assim, o tratamento deve ser direcionado especificamente para a ROS mais prejudicial.

Conclusões

8 CONCLUSÕES

As conclusões foram divididas de acordo com os resultados obtidos e discutidos em cada experimento.

8.1 *Conclusões Experimento 1*

Conclui-se que a temperatura de armazenamento do epidídimo influencia os espermatozóides epididimários, comprometendo a fecundação *in vitro*, sendo a temperatura de 4ºC a mais adequada para a manutenção da capacidade fecundante da amostra.

Conclui-se também que o estresse oxidativo não foi influenciado pelas diferentes temperaturas de armazenamento.

Além disto, pode-se verificar um papel antioxidante das gotas distais, sugerindo ser esta uma das funções destas alterações morfológicas no sêmen da cauda do epidídimo.

8.2 *Conclusões Experimento 2*

Concluiu-se que, nas condições do presente experimento:

1) A armazenagem dos epidídimos a 4ºC é preferível quando comparada com a armazenagem a 34ºC, visto que, nesta última, observou-se uma diminuição da motilidade, da integridade da membrana plasmática e do potencial mitocondrial dos espermatozóides;

2) A criopreservação de espermatozóides epididimários induziu um decréscimo significante na qualidade espermática (i.e. integridade de membrana e motilidade);

3) As correlações encontradas entre potencial de membrana mitocondrial, integridade de membrana e motilidade sugerem que a diminuição da motilidade induzida pela maior temperatura de armazenagem dos epidídimos e pela criopreservação, ocorreram devido a diminuição da atividade mitocondrial e a danos de membrana, respectivamente.

8.3 Conclusões Experimento 3

Concluiu-se que, nas condições do presente experimento:

1) A armazenagem dos epidídimos a 4ºC é preferível quando comparada com a armazenagem a 34ºC, visto que, nesta última, observou-se uma maior fecundidade *in vitro* das amostras criopreservadas;

2) O efeito deletério da temperatura de armazenamento do epidídimo na qualidade espermática após a criopreservação não foi diretamente causada pelo estresse oxidativo.

8.4 *Conclusões Experimento 4*

Concluiu-se que, nas condições do presente experimento a adição de antioxidantes e ácido decosaexanóico no diluidor melhora alguns aspectos da qualidade espermática do sêmen coletado do epidídimo, dependendo de qual antioxidante, assim como das concentrações utilizadas.

Referências

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 1, p. 829-843, 2003.

AHLQVIST, J. Equation for osmotic pressure in of serum protein (fractions). **Journal of Applied Physology**, v. 96, n. 2, p. 762-765, 2004.

AITKEN, R. J. The amoroso lecture. The human spermatozoon - a cell in crisis? **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 1, p. 1-7, 1999.

AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; HARKISS, D. Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, n. 2, p. 441-450, 1993.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the eficacy of sperm preparations techniques. **Journal of Andrology**, v. 9, n. 3, p. 367-376, 1988.

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

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

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

AITKEN, R. J.; WINGATE, J. K.; DE IULIIS, G. N.; KOPPERS, A. J.; MCLAUGHLIN, E. A. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 4154-4163, 2006.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against lost of motility. **Biology of Reproduction**, v. 29, n. 3, p. 548-555, 1983.

ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L.; STOREY, B. T. Spontaneus lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**, v. 8, n. 5, p. 338-348, 1987.

AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bull. vii. Morphology of epididymal sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 45, n. 12, p. 1516–1526, 1962.

ANDERSON, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 111-112, n. 1, p. 1-14, 1998.

ARAÚJO, G. P. Embrapa Cerrados valida tecnologia de recuperação de espermatozóides extraídos de bovinos mortos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Planaltina, 29 dez. 2008. Disponível em: http://www.cpac.embrapa.br/noticias/noticia_completa/10/. Acesso em: 20 jan. 2009.

ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W. J.; SIKKS, S. C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 7/8, p. 869-880, 1999.

AUGER, J.; RONOT, X.; DADOUNE, J. P. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. **Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 439–448, 1989.

AZIZ, N.; SALEH, R. A.; SHARMA, R. K.; LEWIS-JONES, I.; ESFANDIARI, N.; THOMAS JR, A. J.; AGARWAL, A. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 2, p. 349-354, 2004.

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

BARTELS, P.; LUBBE, K.; SMITH, R. L.; GODKE, R. A. Morphological changes of caudal epididymal spermatozoa of african buffalo (Syncerus caffer) after storage at ~6ºC. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p 279, 1989.

BIELSKI, B. H.; RICHTER, H. W.; CHAN, P. C. Some properties of the ascorbate free radical. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 258, n. 1, p. 231 –237, 1975.

BJÖRNEBOE, A.; BJÖRNEBOE, G. E. A.; DREVON. C. A. Absorption,transport and distribution of Vitamin E. **Journal of Nutrition**, v. 120, n. 1, p. 233-242, 1990.

BREQUE, C. O.; SURAI, P. O.; BRILLARD, J. P. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 66, n. 3, p. 314-323, 2003.

BRIZ, M. D.; BONET, S.; PINART, B.; EGOZCUE, J.; CAMPS, R. Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus and cauda regions of the epididymis, **Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 175–188, 2005.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation, **Methods of Enzymology**, v. 52, n. 1, p. 302–310, 1978.

CALAMERA, J. C.; FERNANDEZ, P. J.; BUFFONE, M. G.; ACOSTA, A. A.; DONCEL, G. F. Effect of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. **Andrologia**, v. 33, n. 2, p. 79-86, 2001.

CASSANI, P.; BECONI, M. T.; O'FLAHERTY, C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidatrion, dynamics and morphological parameters in canine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 86, n. 1/2, p. 163-173, 2005.

CHATTERJEE, S.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione, **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 1, p. 498–506, 2001

CHAUDIERE, J.; WILHELMSEN, E. C.; TAPPEL, A. L. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acid and other mercaptans. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 259, n. 2, p. 1043-1050, 1984.

CHOW, C. K. Vitamin E in plasma, erythrocytes and erythrocyte membranes. **Progress in clinical and biological research**, v. 292, n. 3, p. 445-51, 1989.

COOPER, T. G.; YEUNG, C. H. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. **Microscopic Research and Technology,** v.61, n. 1, p. 28-38, 2003.

COOPER, T. G.; YEUNG, C. H.; FETIC, S.; ALIGHOLI, S.; NIESCHLAG, E. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. **Human Reproduction**, v. 19, n. 10, p. 2283-2288, 2004.

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

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 48-54, 1997.

DE PAUW, I. M. C.; VAN SOOM, A.; MINTIENS, K.; VERBERCKMOES, S.; DE KRUIF, A. In vitro survival of bovine spermatozoa stored at room temperature under epididymal conditions. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 1093-1107, 2003.

DIX, T. A.; AIKENS, J. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 6, n. 1, p. 2-18, 1993.

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.

DONNELLY, E. T.; STEELE, E. K.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. N. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertil men before and after cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 16, n. 6, p. 1191-1199, 2001.

ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L; WORLEY, K. C.; GIBBS, R. A.; MUZNY, D. M.; WEINSTOCK, G. M.; ADELSON, D. L.; EICHLER, E. E.; ELNITSKI, L.; GUIGÓ, R.; HAMERNIK, D. L.; KAPPES, S. M.; LEWIN, H. A.; LYNN, D. J.; NICHOLAS, F. W.; REYMOND, A.; RIJNKEL, S. M.; SKOW, L. C.; ZDOBNOV, E. M.; SCHOOK, L.; WOMACK, J.; ALIOTO, T.; ANTONARAKIS, S. E.; ASTASHYN, A.; CHAPPLE, C. E.;

CHEN, H. C.; CHRAST, J.; CÂMARA, F.; ERMOLAEVA, O.; HENRICHSEN, C. N.; HLAVINA, W.; KAPUSTIN, Y.; KIRYUTIN, B.; KITTS, P.; KOKOCINSKI, F.; LANDRUM, M.; MAGLOTT, D.; PRUITT, K.; SAPOJNIKOV, V.; SEARLE, S.M.; SOLOVYEV, V.; SOUVOROV, A.; UCLA, C.; WYSS, C.; ANZOLA, J. M.; GERLACH, D.; ELHAIK, E.; GRAUR, D.; REESE, J. T.; EDGAR, R. C.; MCEWAN, J. C.; PAYNE, G. M.; RAISON, J. M.; JUNIER, T.; KRIVENTSEVA, E. V.; EYRAS, E.; PLASS, M.; DONTHU, R.; LARKIN, D. M.; REECY, J.; YANG, M. Q.; CHEN, L.; CHENG, Z.; CHITKO-MCKOWN, C. G.; LIU, G. E.; MATUKUMALLI, L. K.; SONG, J.; ZHU, B.; BRADLEY, D. G.; BRINKMAN, F. S.; LAU, L. P.; WHITESIDE, M. D.; WALKER, A.; WHEELER, T. T.; CASEY, T.; GERMAN, J. B.; LEMAY, D. G.; MAQBOOL, N. J.; MOLENAAR, A. J.; SEO, S.; STOTHARD, P.; BALDWIN, C. L.; BAXTER, R.; BRINKMEYER-LANGFORD, C. L.; BROWN, W. C.; CHILDERS, C. P.; CONNELLEY, T.; ELLIS, S. A.; FRITZ, K.; GLASS, E. J.; HERZIG, C. T.; IIVANAINEN, A.; LAHMERS, K. K.; BENNETT, A. K.; DICKENS, C. M.; GILBERT, J. G.; HAGEN, D. E.; SALIH, H.; AERTS, J.; CAETANO, A. R.; DALRYMPLE, B.; GARCIA, J. F.; GILL, C. A.; HIENDLEDER, S. G.; MEMILI, E.; SPURLOCK, D.; WILLIAMS, J. L.; ALEXANDER, L.; BROWNSTEIN, M. J.; GUAN, L.; HOLT, R. A.; JONES, S. J.; MARRA, M. A.; MOORE, R.; MOORE, S. S.; ROBERTS, A.; TANIGUCHI, M.; WATERMAN, R. C.; CHACKO, J.; CHANDRABOSE, M. M.; CREE, A.; DAO, M. D.; DINH, H. H.; GABISI, R. A.; HINES, S.; HUME, J.; JHANGIANI, S. N.; JOSHI, V.; KOVAR, C. L.; LEWIS, L. R.; LIU, Y. S.; LOPEZ, J.; MORGAN, M. B.; NGUYEN, N. B.; OKWUONU, G. O.; RUIZ, S. J.; SANTIBANEZ, J.; WRIGHT, R. A.; BUHAY, C.; DING, Y.; DUGAN-ROCHA, S.; HERDANDEZ, J.; HOLDER, M.; SABO, A.; EGAN, A.; GOODELL, J.; WILCZEK-BONEY, K.; FOWLER, G. R.; HITCHENS, M. E.; LOZADO, R. J.; MOEN, C.; STEFFEN, D.; WARREN, J. T.; ZHANG, J.; CHIU, R.; SCHEIN, J. E.; DURBIN, K. J.; HAVLAK, P.; JIANG, H.; LIU, Y.; QIN, X.; REN, Y.; SHEN, Y.; SONG, H.; BELL, S. N.; DAVIS, C.; JOHNSON, A. J.; LEE, S.; NAZARETH L. V.; PATEL, B. M.; PU, L. L.; VATTATHIL, S.; WILLIAMS, R. L. Jr.; CURRY, S.; HAMILTON, C.; SODERGREN, E.; WHEELER, D. A.; BARRIS, W.; BENNETT, G. L.; EGGEN, A.; GREEN, R. D.; HARHA,Y. G. P.; HOBBS, M.; JANN, O.; KEELE, J. W.; KENT, M. P.; LIEN, S.; MCKAY, S. D.; MCWILLIAM, S.; RATNAKUMAR, A.; SCHNABEL, R. D.; SMITH, T.; SNELLING, W. M.; SONSTEGARD, T. S.; STONE, R. T.; SUGIMOTO, Y.; TAKASUGA, A.; TAYLOR, J. F.; VAN TASSELL, C. P.; MACNEIL, M. D.; ABATEPAULO, A. R.; ABBEY, C. A.; AHOLA, V.; ALMEIDA, I. G.; AMADIO, A. F.; ANATRIELLO, E.; BAHADUE, S. M.; BIASE, F. H.; BOLDT, C. R.; CARROLL, J. A.; CARVALHO, W. A.; CERVELATTI, E. P.; CHACKO, E.; CHAPIN, J. E.; CHENG, Y.; CHOI, J.; COLLEY, A. J.; DE CAMPOS, T. A.; DE DONATO, M.; SANTOS, I. K.; DE OLIVEIRA, C. J.; DEOBALD, H.; DEVINOY, E.; DONOHUE, K. E.; DOVC, P.; EBERLEIN, A.; FITZSIMMONS, C. J.; FRANZIN, A. M..; GARCIA, G. R.; GENINI, S.; GLADNEY, C. J.; GRANT, J. R.; GREASER, M. L.; GREEN, J. A.; HADSELL, D. L.; HAKIMOV, H. A.; HALGREN, R.; HARROW, J. L.; HART, E. A.; HASTINGS, N.; HERNANDEZ, M.; HU, Z. L.; INGHAM, A.; ISO-TOURU, T.; JAMIS, C.; JENSEN, K.; KAPETIS, D.; KERR, T.; KHALIL, S. S.; KHATIB, H.; KOLBEHDARI, D.; KUMAR, C. G.; KUMAR, D.; LEACH, R.; LEE, J. C.; LI, C.; LOGAN, K. M.; MALINVERNI, R.; MARQUES, E.; MARTIN, W. F.; MARTINS, N. F.; MARUYAMA, S. R.; MAZZA, R.; MCLEAN, K. L.; MEDRANO, J. F.; MORENO, B. T.; MORÉ, D. D.; MUNTEAN, C. T.; NANDAKUMAR, H. P.; NOGUEIRA, M. F.; OLSAKER, I.; PANT, S. D.; PANZITTA, F.; PASTOR, R. C.; POLI, M. A.; POSLUSNY, N.; RACHAGANI, S.; RANGANATHAN, S.; RAZPET, A.; RIGGS, P. K.; RINCON, G.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; ROMERO, N. E.; ROSENWALD, A.; SANDO, L.; SCHMUTZ, S. M.; SHEN, L.; SHERMAN, L.; SOUTHEY, B. R.; LUTZOW, Y. S.;

SWEEDLER, J. V.; TAMMEN, I.; TELUGU, B. P.; URBANSKI, J. M.; UTSUNOMIYA, Y. T.; VERSCHOOR, C. P.; WAARDENBERG, A. J.; WANG, Z.; WARD, R.; WEIKARD, R.; WELSH, T. H. Jr.; WHITE, S. N.; WILMING, L. G.; WUNDERLICH, K. R.; YANG, J.; ZHAO, F. Q. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v. 324, n. 5926, p. 522-528, 2009.

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

ERNSTER, L.; FOSMARK, P.; NORDENBRAND, K. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes. Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology - Spec. No**, p. 548-551, 1992.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 30, n. 3, p. 279-280, 1982.

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.

FARISS, M.W. Cadmium toxicity: Unique cytoprotective properties of alpha tocopheryl succinate in hepatocytes. **Toxicology**, v. 69, n. 1, p. 63-77, 1991.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATIAS, D.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A. E.; ESTESO, M. C.; MONTORO, V.; GARDE, J. J. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 1, p. 93-104, 2009.

FISCHER, M. A.; WILLIS, J.; ZINI, A. Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. **Urology**, v. 61, n. 1, p. 207-211, 2003.

FOOTE, R. H. Fertilizing ability of epididymal sperm from dead animals (Letter to the editor). **Journal of Andrology**, v. 21, n. 3, p. 355, 2000.

FRAGA, G. G.; MOTCHNIK, P. A.; SHIGENAGA, M. K.; HELBROCK, J. H.; JACOB, R. A.; AMES, B. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 88, p. 11003-11006, 1991.

FRENOUX, J. M.; PROST, E. D.; BELLEVILLE, J. L.; PROST, J. L. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutrition,** v. 131, n. 1, p. 39-45, 2001.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 2, p. 276-84, 1995.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. **Molecular Reproduction and Development,** v. 53, n. 2, p. 222-229, 1999.

GIL-GUZMAN, E.; OLLERO, M.; LOPEZ, M. C.; SHARMA, R. K.; ALVAREZ, J. G.; THOMAS, A. J.; AGARWAL, A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction,** v. 16, n. 9, p. 1922-1930, 2001.

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

GOOVAERTS, I. G. F.; HOFLACK, G. G.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; DE KRUIF, A.; BOLS, P. E. J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 323-330, 2006.

GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. **International Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 225-231, 1994.

GRIVEAU, J. F.; RENARD, P.; LE LANNOU, D. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. **International Journal of Andrology**, v. 17, n. 6, p. 300-307, 1994.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. 7th ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2000, 542 p.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 14-22, 1991.

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

HEROLD, F. C.; GERBER, D.; AURICH, J. E. Influence of homologous seminal plasma on bovine epididymal semen frozen with Triladyl™ or Andromed®. **Wien Tierärztl Mschr** , v. 90, n. 1. p. 58-61, 2003.

HINSHAW, D. B.; SKLAR, L. A.; BOHL, B.; SCHRAUFSTATTER, I. U.; HYSLOP, P. A.; ROSSI, M. W.; SPRAGG, R. G.; COCHRANE C. G. Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. **The American Journal of Pathology**, v. 123, n. 3, p. 456-464, 1986.

HISHINUMA, M.; SUZUKI, K.; SEKINE, J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4ºC. **Theriogenology**, v. 59, n. 3/4, p. 813-820, 2003.

HORI, T.; HAGIUDA, K.; ENDO, S.; HAYAMA, A.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Unilateral intrauterine insemination with cryopreserved caudal epididymal sperm recovered

from refrigerated canine epididymides. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 67, n. 11, p. 1141-1147, 2005.

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

IKEDA H, KIKUCHI K, NOGUSHI J, TAKEDA H, SHIMADA A, MIZOKAMI T, KANEJO H. Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 57, n. 2, p. 1309-1318, 2002.

JEULIN, C.; SOUFIR, J. C.; WEBER, P.; LAVAL-MARTIN, D.; CALVAYRAC, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. **Gamete Research**, v. 24, n. 1, p. 185-196, 1989.

JONES, R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 53 , n. 1, p. 73–84, 1998

JONES, R.; MANN, T. Damage to spermatozoa by peroxidation endogenous phospholipids. Journal of Reproduction and Fertility, v. 50, n. 2, p. 261-68, 1977.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology,** v. 60, n. 2, p. 1249-1259, 2003.

KATSKA, L.; RINSKA, B.; SMORAG, Z. Effect of seminal plasma on the in vitro fertilizability of bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 44, n. 2, p. 23-31, 1996.

KIKUCHI, K.; NAGAI, T.; KASHIWAZAKI, N.; IKEDA, H.; NOGUCHI, J.; SHIMADA, A. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4ºC. **Theriogenology**, v. 50, n. 4, p. 615-23, 1998.

KILLIAN, I.; LUBBE, K.; BARTELS, P.; FRIEDMANN, Y.; DENNISTON, R. S. Evaluating epididymal sperm of African wild ruminants: longevity when stored at 4°C and viability following cryopreservation. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 336 2000. Abstract.

KISHIKAWA, H.; TATENO, H.; YANAGIMACHI, R. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4ºC**. Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, n. 2, p. 217-222, 1999.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effects of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 2, p. 151-157, 1996.

KOPPERS, A. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; MCLAUGHLIN, E. A.; AITKEN, R. J. Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3199-3207, 2008.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a high polarized cell, the mammalian. **Journal of Membrane Biology,** v. 165, n. 1, p.1-10, 1998.
.
LANGLAIS, J.; ROBERTS D. A molecular membrane model of capacitation and the acrosome reaction of mammalian sperm membranes. **Gamete Research**, v. 12, n. 1, p. 183-224, 1985.

LEATH, W. M. F.; NORTHOP, C. A.; HARRISON, F. A.; COX, R. W. Effect of linoleic acid and linolenic acid on testicular development in rats. **Archives of Andrology**, v. 29, n. 2, p. 221-231, 1983.

LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): Scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2000.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; TERMINALI, O.; PASSI, S.; DONDERO, F. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. **Human Reproduction**, v. 9, n. 6, p. 2044-2050, 1994.

MAILLARD, V.; HOINARD, C.; ARAB, K.; JOURDAN, M. L.; BOUGNOUX, P.; CHAJES, V. Dietary beta-carotene inhibits mammary carcinogenesis in rats depending on dietary alpha-linolenic acid content. **The British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 1, p. 18-21, 2006.

MAMMOTO, A.; MASUMOTO, N.; IKEBUCHI, Y.; OHMICHI, M.; TASAKA, K.; MIYAKE, A. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 2, p. 1063–1068, 1996.

MARTINEZ-PASTOR, F.; ANEL, L.; GUERRA, C.; ALVAREZ, M.; SOLER, A. J.; GARDE, J. J.; CHAMORRO, C.; DE PAZ, P. Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 1847-1856, 2006.

MARTINS, F.; DRIESSEN, K.; MELO COSTA, P.; CARVALHO-NETO, J. O.; SOUSA, R. V.; RUMPF, R.; DODE, M. N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 1-2, p. 50-57, 2009.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 5, p. 83-104, 2000.

NEUZIL, J.; THOMAS, S. R.; STOCKER, R. Requirement for, promotion, or inhibition by alpha-tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 1/2, p. 57-71, 1997.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZUGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. . Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822-828, 2006.

NICHI, M.; DE CLERCQ, J. B. P.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, V. H.; BOLS, P. E. J. Effect of bull epididymis storage conditions on cryopreserved epididymal sperm *in vitro* fertility and lipid peroxidation status. In 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 106, 2007a.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G. F.; CORTADA, C. N. M.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B. P.; BOLS, P. E. J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34ºC. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007b.

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.; POWERS, R. D.; ALVAREZ, J. G. Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. **Molecular Reproduction Development**, v. 55, n. 3, p. 326–334, 2000.

PAPPAS, A. C.; ACAMOVIC, T. O.; SPARKS, N. H.; SURAI, P. F.; MCDEVITT, R. M. Effects of supplementing broiler breeder diets with organoselenium compounds and polyunsaturated fatty acids on hatchability. **Poultry Science**, v. 85, n. 9, p. 1593-1594, 2006.

PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 653-668, 1985.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotrophic phase behaviour of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.

PEREZ-GARNELO, S. S.; BORQUE, C.; DELELAUX, M.; TALAVERA, C.; LOPEZ, M.; DE LA FUENTE, H. Post-thaw seminal quality of spermatozoa obtained from the epididymis in Dorcas Gazelle (Gazella dorcas neglecta). **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 589, 2001

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.

SAID, T. M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K.; MASCHA, E.; SIKKA, S. C.; THOMAS, A. J. Jr. Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility. **Fertility and Sterility**, v. 82, n. 4, p. 871-7, 2004.

SAID, T. M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K.; THOMAS JUNIOR, A. J.; SIKKA, S. C. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 1, p. 95-103, 2005a.

SAID, T. M.; AZIZ, N.; SHARMA, R. K.; LEWIS-JONES, I.; THOMAS JUNIOR, A. J.; AGARWAL, A. Novel association between sperm deformity index and oxidtive stress-induced DNA damage in infertile male patients. **Asian Journal of Andrology**, v. 7, n. 2, p. 121-126, 2005b.

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

SANKAI, T.; TSUCHIYA, H.; OGONUKI, N. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 55, n. 8, p. 1759-1768, 2001.

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

SCHULZE-OSTHOFF, K.; BAKKER, A. C.; VANHAESEBROECK, B.; BEYAERT, R.; JACOB, W. A.; FIERS, W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 4, p. 5317–5323, 1992.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **European Journal of Biochemics**, v. 215, n. 1, p. 213-219, 1993.

SONGSASEN, N.; TONG, J.; LEIBO, S. P. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. **Journal of Experimental Zoology**, v. 280, n. 3, p. 189–196, 1998.

TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygens species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 189-198, 2001.

THIELE, J. J.; FREISLEBEN, H. J.; FUCHS, J.; OSCHENDORF, F. R. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationship with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 110-115, 1995.

THUNDATHIL, J.; PALASZ, A. T.; BARTH, A. D.; MAPLETOFT, R. J. The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 3/4, p. 181-192, 2001.

TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, A. S.; AITKEN, E. J. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. **Human Reproduction**, v. 13, n. 6, p. 1429-1436, 1998.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, n. 1, p. 31-39, 2004.

VON SCHACKY, C.; ANGERER, P.; KOTHNY, W.; THEISEN, K.; MUDRA, H. The effect of dietary omega-3 fatty acids on coronary atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Annals of Internal Medicin**e, v. 130, n. 7, p. 554-562, 1990.

WALD, M.; ROSS, L. S.; PRINS, G. S.; CIESLAK-JANZEN, J.; WOLF, G.; NIEDERBERGER, C. S. Analysis of outcomes of Cryopreserved surgically Retrieved Sperm for IVF/ICSI. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 1, p. 60-65, 2006.

WANG, A. W.; ZHANG, A.; IKEMOTO, I.; ANDERSON D. J.; LOUGHLIN, K. R. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, n. 2, p. 921–925, 1997.

WANG, X.; SHARMA, R. K.; GUPTA, A.; GEORGE, V.; THOMAS, A. J.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 2, p. 844-850, 2003.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction and Fertility Development,** v. 5, n. 6, p. 639-658, 1993.

WU, G.; FANG, Y. Z.; YANG, S.; LUPTON, J. R.;TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489-492, 2004.

YU, I.; LEIBO, S. P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4ºC. **Theriogenology**, v. 57, n. 2, p. 1179-1190, 2002.

Anexos

ANEXO A

Meio HEPES-TALP

- 114 mM de NaCl (VWR, Haasrode, Bélgica);
- 3,1 mM de KCl, 2 mM de $NaHCO_3$;
- 0.3 mM de NaH_2PO_4;
- 10 mM de HEPES;
- 2.1 mM de $CaCl_2$;
- 0.4 mM de $MgCl_2$;
- phenol red (0.5%);
- 1 mM de piruvato de sódio;
- 36 mM de lactato de sódio;
- 50 µg/mL de gentamicina (Invitrogen™ life technologies, Merelbeke, Belgium);
- 0.4 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA).

ANEXO B

Meio de Maturação:

- TCM-199 tamponado com bicarbonato (Invitrogen™ life technologies, Merelbeke, Belgium;
- 20% soro fetal bovino (FCS);
- 0.4 mM de glutamina;
- 0.2 mM de piruvato de sódio;
- 50 µg/mL de gentamicina.

ANEXO C

Preparo do Gradiente de Percoll:

- Percoll 90% em Solução Tyrode Hepes tamponada suplementada com albumina, lactato e piruvato -TALP) mantida por 1 semana a 4°C;
- Percoll 45% (mistura de Percoll 90% e Hepes-TALP tamponada), preparada imediatamente antes da utilização;

Um gradiente de densidade foi preparado pipetando 2 mL de uma camada de alta densidade (90%) em um tubo cônico de poliestireno graduado com capacidade de 15 mL. Gentilmente, 2 mL de uma camada de baixa densidade (45%) foi adicionada a este tubo. Posteriormente, uma aliquota de 0,5 mL de semen foi pipetada sobre a camada superior. Os gradients foram então centrifugados a 300G por 20 minutos. Após o descarte do diluidor e da maior parte do gradiente, o pelete formado foi transferido para um tubo cônico de poliestireno graduado com capacidade de 15 mL e lavado com meio Tyrode para a utilização na FIV.

ANEXO D

Meio de fecundação:

- sal balanceado de Tyrode;
- 25 mM de $NaHCO_3$;
- 1 mM de piruvato de sódio;
- 36 mM de lactato de sódio;
- 50 µg/mL de gentamicina;
- 6 mg/mL de BSA;
- 10 µg/mL de heparina.