UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL

MARIANA DE PAULA RODRIGUES

***Novas percepções sobre o uso de lecitina de soja na
criopreservação e fertilidade de espermatozoide bovino***

São Paulo
2014

MARIANA DE PAULA RODRIGUES

**Novas percepções sobre o uso de lecitina de soja na criopreservação
e fertilidade de espermatozoide bovino**

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:

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

São Paulo
2014

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

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

T.2920
FMVZ

Rodrigues, Mariana de Paula

Novas percepções sobre o uso de lecitina de soja na criopreservação e fertilidade de espermatozoide bovino / Mariana de Paula Rodrigues. -- 2014.

121 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Ácido ascórbico. 2. Antioxidante. 3. Diluidor seminal. 4. Gema de ovo. 5. Superóxido dismutase.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Efeito de diferentes diluidores e tratamentos antioxidantes sobre a criopreservação e fertilidade a campo e *in vitro* de sêmen bovino”, protocolado sob o nº 2982/2013, utilizando 480 (quatrocentos e oitenta) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10/4/2013.

We certify that the Research “Different extenders and antioxidants treatments effects on bovine semen cryopreservation, field and *in vitro* fertility”, protocol number 2982/2013, utilizing 480 (four hundred and eighty) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/10/2013.

São Paulo, 15 de abril de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RODRIGUES, Mariana de Paula

Título: Novas percepções sobre o uso de lecitina de soja na criopreservação e fertilidade de espermatozoide bovino

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(a).Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico...

... A minha avó Maria de Paula (*in memoriam*)

Uma mulher que em meio toda fragilidade da idade foi muito forte, em meio ao caos pelo qual passou emanava paz e em meio toda rispidez da situação manteve sempre o sorriso doce no rosto.

“Vó”, obrigada por passar noites em claro quando eu estava doente, por me dar a mão para que eu conseguisse pegar no sono. Obrigada por ensinar-me o bê-a-bá, a tabuada, o português e a redação. Obrigada pelas vitaminas de fruta, pelos bolos e pelos almoços de todos os dias. Obrigada pela compreensão, pelos conselhos e pelas orações. Tudo que sou agora foi pelo seu esforço. Tenha certeza de que você fez muito mais do que sua tarefa nesse mundo.

Infelizmente, hoje só posso pedir a Deus que te dê um abraço bem apertado e dizer o quanto sou grata por haver dado a benção de colocá-la em minha vida.

Me disseram, que um dia a saudade deixa de ser dor e vira história para contar e guardar para sempre, espero que seja verdade.

Fica na lembrança, o sorriso aberto ao me ver chegar. Fica na vida, o amor incondicional que você me deu. Fica na formação, as lições ensinadas e as palavras corrigidas. Fica também o exemplo de força, humildade, fé, paciência e alegria, apesar de todas as dificuldades.

Porém, fica presente, a imensa saudade, que apenas os que tiveram o privilégio de conviver com você saberão a dimensão.

Tê amo...

... Minha avó, minha madrinha, meu exemplo de vida. E agora, meu ajo da guarda.

"E ali logo em frente a esperar pela gente o futuro está
E o futuro é uma astronave que tentamos pilotar
Não tem tempo nem piedade nem tem hora de chegar
Sem pedir licença muda nossa vida
Depois convida a rir ou chorar

Nessa estrada não nos cabe conhecer ou ver o que virá
O fim dela ninguém sabe bem ao certo onde vai dar
Vamos todos numa linda passarela
De uma aquarela que um dia enfim
Descolorirá."

(Aquarela - Toquinho)

Agradeço...

Primeiramente, agradeço a **Deus** pela graça da vida, por me presentear com uma família maravilhosa que me ensinou o significado da palavra amor, amizade e respeito e a difícil arte de colocar tudo isso em prática; pela oportunidade ímpar de estar dentro de uma das universidades mais renomadas do mundo, e também por colocar em meu caminho pessoas tão especiais como as que eu conheci durante essa jornada de pós-graduação, pessoas que me ajudaram sem me conhecer e mesmo com tantas obrigações mais importantes.

Mãe, obrigada por estar sempre ao meu lado, alegrando nas horas boas, me apoiando nas horas difíceis e me aconselhando nesse confuso caminho da vida. Obrigada por ser minha amiga, por estar sempre presente. Mesmo longe, sei que posso contar com você, e saiba que todos os dias penso em você, queria poder te ter sempre presente, mas a vida as vezes toma rumos que não esperamos, mesmo assim, saiba que a força que você me dá é suficiente para que eu não desista dos meus sonhos.

Pai, obrigada pelas lições de vida. Você é meu exemplo de força e perseverança, de que quando se quer pode chegar em qualquer lugar. Obrigada pela paciência, pelas broncas e pela disciplina, hoje me deparo com situações que você me ensinou como lidar. Obrigada pelas oportunidades que você me deu e pelas renúncias que optou por fazer.

Fernanda e Juliana, antes de mais nada, obrigada por serem irmãs, pela amizade, pelas trocas, pelas ajudas. Obrigada por estarem presentes nos momentos difíceis e obrigada pelos bons momentos.

Ao **Prof. Renato Campanarut Barnabe**, por aceitar-me como orientada e principalmente, por passar seus ensinamentos tão preciosos. Exemplo de força e perseverança, o qual se manteve ativo até o momento que pôde. Infelizmente, teve que partir, mas deixou uma imensa marca na história da reprodução animal e nos corações de cada um que teve o privilégio de conhecê-lo.

Ao **Prof. Rubens Paes de Arruda**, professor e grande amigo. Obrigada por aceitar-me como “filha adotiva” e orientar-me no trecho final do caminho. Agradeço pelos conselhos durante

esses meses de convivência. Conselhos esses que me ajudaram a tomar decisões importantes, ajudaram a conformar-me com certas situações que não podia mudar e que me confortaram em outras situações em que a vida me colocou. Agradeço pelas preciosas lições, que ao senhor levou uma vida para juntá-las e as passou a mim com todo prazer. Agradeço pelo conhecimento técnico e pelas ajudas profissionais. Hoje é difícil encontrar professores que se preocupam com a formação pessoal e profissional do aluno como o senhor faz, e uma vez disse e aqui repito, não mude sua maneira de ser, apesar de poucos compreenderem, esses poucos serão os que realmente valerão a pena ter em convívio. Continue sendo essa pessoa exigente e detalhista, pois somente dessa maneira é que se consegue formar ótimos profissionais. Não tenho palavras para agradecer por todas essas lições preciosas que um dia a vida me cobrará, e eu estarei preparada para enfrentá-las. Minha meta profissional é ser tão boa professora, orientadora e educadora como o senhor.

Ao **Fabián**, amigo, companheiro, namorado, sócio e pessoa que quero compartilhar vitórias e derrotas durante essa vida. Obrigada pela ajuda no experimento, na profissão e no dia a dia. Obrigada por aguentar-me nos momentos mais difíceis e nos momentos em que o nervosismo do experimento me fez perder “um pouquinho” a paciência. Obrigada por estar sempre aqui. E obrigada por fazer da minha vida uma história completa.

Aos **amigos** de “Pira”, por me receberem super bem e me integrarem na família VRA.

A **Yeda Watanabe**, ao **Daniel Carlino** e a **Vitrogen**, por realizarem a FIV, parte fundamental do experimento que enriqueceu muito o trabalho.

A **Camila Mendes**, pelas análises laboratoriais.

Aos professores e companheiros **André Furugen**, **José Nélio** e **Simone Martins**, por deixarem de lado tantas obrigações para realizar as estatísticas desse experimento. Muito obrigada pela imensa ajuda.

A professora **Letícia Oliveira**, pela ajuda na correção dos artigos científicos e pelas sugestões que enriqueceram muito os trabalhos.

Agradeço também as **Fazendas** Lola Miño e Cuapé, por permitirem o uso dos animais, sem eles não haveria como seguir adiante com esse trabalho.

Ao **Eng. Ruggilo**, pela ajuda com o manejo das fazendas, pela ajuda profissional, e pela confiança depositada em mim.

A TK reprodução, pelo empréstimo da máquina de congelação seminal, sem a qual o experimento não teria uniformidade no processo de criopreservação.

Aos meus alunos e hoje companheiros de profissão **Diego Silva** e **Jorge Rejala**, pela ajuda nas inseminações.

Agradeço a **Menina** pela fiel companhia durante a redação da tese, e por tornar os momentos difíceis mais agradáveis.

Aos amigos **Carol, Roberta e Diego**, pela amizade e ajuda durante esses difíceis anos de pós-graduação, obrigada pelas risadas e por fazer mais engraçados os dias cinzentos.

Agradeço aos **professores** do Departamento de Reprodução Animal, pelas conversas nos corredores, pelos ensinamentos, pela confiança e carinho.

As queridas **Harumi, Thaís e Roberta** pela competência, excelente serviço e principalmente pela paciência. Obrigada pelas conversas e ajudas.

A **Elza Faquim**, pela paciência, pelo excelente trabalho e pela ajuda com a correção da tese.

A **CAPES**, pela inestimável ajuda financeira.

A **Universidade de São Paulo**, a **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** e ao **Departamento de Reprodução Animal**, pela oportunidade da pós-graduação e pela excelente formação profissional.

"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado dos amigos, com certeza vai mais longe" (autor desconhecido)

RESUMO

RODRIGUES, M. P. **Novas percepções sobre o uso de lecitina de soja na criopreservação e fertilidade de espermatozoide bovino.** [New insights on the use of soybean lecithin on bovine sperm cryopreservation and fertility]. 2014. 121f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A grande demanda por proteína animal e a importância que a criação bovina exerce sobre a economia nacional, vêm exigindo eficientes sistemas de produção. A preservação e disseminação da genética do rebanho bovino dependem de biotecnologias como a criopreservação espermática, inseminação artificial e fertilização *in vitro*. No entanto, atualmente muito tem sido discutido sobre o uso da gema de ovo nos diluidores seminais. Pois apresentam variabilidade em sua composição e risco de contaminação microbiológica. Em contrapartida, apesar dos diluidores sintetizados com lecitina de soja não fornecerem esses riscos, seus resultados não são muito satisfatórios na criopreservação espermática bovina. Com base na hipótese de que a suplementação do diluidor seminal à base de lecitina de soja com antioxidantes, preserve as características das células espermáticas de maneira tão eficiente quanto à gema de ovo, o objetivo do presente experimento foi comparar o efeito do diluidor à base de gema de ovo com o diluidor à base de lecitina de soja (com e sem antioxidantes), sobre a manutenção da funcionalidade e fertilidade de amostras espermáticas bovinas criopreservadas. Para tal, foram utilizadas amostras seminais de 20 touros Brangus, cujas colheitas foram realizadas pelo método de eletroejaculação e as amostras foram diluídas em 4 grupos de diluidores: LE–lecitina de soja (sem a adição de antioxidantes); LA–lecitina de soja suplementada com ácido ascórbico (AA, 4,5mM); LS–lecitina de soja suplementada com superóxido dismutase (SOD, 60UI/mL) e GO–gema de ovo (sem adição de antioxidantes). O sêmen foi então, criopreservado de maneira automatizada. As amostras foram descongeladas e analisadas quanto aos testes laboratoriais de motilidade computadorizada do espermatozóide (CASA); integridade de membrana plasmática (eosina/nigrosina); integridade de membrana acrossomal (fast Green/ rosa bengala); atividade citoquímica mitocondrial (DAB); susceptibilidade do DNA à desnaturação (SCSA); índice de estresse oxidativo induzido (TBARS). Além disso, foram realizados testes para verificar o potencial de fertilidade das amostras espermáticas criopreservadas. A fertilidade

in vivo foi realizada pela técnica de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), utilizando 450 fêmeas bovinas, seguido de exame ultrassonográfico para avaliação de prenhez. Teste de fertilidade *in vitro*, foi realizado pela técnica de produção *in vitro* de embriões (PIV) com o uso de ovários de frigoríficos, a classificação do desenvolvimento embrionário e a avaliação da motilidade espermática foram promovidas no decorrer do processo. Os resultados demonstraram que o diluidor LE apresentou efeito na proteção espermática de maneira semelhante ao diluidor GO. No entanto a suplementação desse primeiro com antioxidantes é uma alternativa para melhorar ainda mais esse processo, já que a taxa de prenhez obtida nos grupos LA e LS é satisfatória em um programa de IATF. Ainda o grupo LS foi o que apresentou melhores resultados no processo de PIV. Concluindo que o diluidor à base de lecitina de soja suplementado com o antioxidante superóxido dismutase seria uma opção para a substituição definitiva dos diluidores sintetizados com gema de ovo.

Palavras-chave: Ácido ascórbico. Antioxidante. Diluidor seminal. Gema de ovo. Superóxido dismutase.

ABSTRACT

RODRIGUES, M. P. **New insights on the use of soybean lecithin on bovine sperm cryopreservation and fertility.** [Novas percepções sobre o uso de lecitina de soja na criopreservação e fertilidade de espermatozoide bovino]. 2014. 121f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Due to the great demand for animal protein and the importance that bovine breeding exert on national economy, efficient production systems have been required. Cattle genetics preservation and dissemination depend on reproductive biotechnologies such as sperm cryopreservation, artificial insemination and *in vitro* fertilization. However, the use of egg yolk-based extender is under discussion nowadays, once there is great variability in its composition and risks of bacteriological contamination. On the other hand, despite soybean lecithin-based extenders do not present these risks, satisfactory results, after bovine sperm cryopreservation, have not been reached yet. Based on the hypothesis that soybean lecithin-based extender supplemented with antioxidants, preserve the sperm cell characteristics so efficient as egg yolk does, the aim of the present experiment was to compare the effects of egg yolk-based extender and soybean lecithin-based extender (with and without antioxidants), on functionality and fertility maintenance of bovine cryopreserved sperm samples. For this, seminal samples from 20 Brangus bulls were used, collects were realized by eletroejaculation method and samples were diluted in 4 extenders group: LE-soybean lecithin-based extender (without antioxidant supplementation); LA- soybean lecithin supplemented with ascorbic acid (AA, 4,5mM); LS- soybean lecithin supplemented with superoxide dismutase (SOD, 60UI/mL) and GO-egg yolk-based extender (without antioxidant supplementation). Then, semen was cryopreserved by automatic method. Samples were thawed and analyzed by laboratorial tests such as computer assisted semen analysis (CASA); plasma membrane integrity (eosin/nigrosin); acrosome membrane integrity (fast green/ rose bengal); mitochondrial cytochemical activity (DAB); susceptibility of chromatin denaturation (SCSA); induced oxidative stress index (TBARS). Furthermore, tests for fertility potential of cryopreserved semen samples were performed. *In vivo* fertility was accessed by timed artificial insemination (TAI), 450 bovine females were inseminated, and ultrasonographical exam was realized for pregnancy detection. *In vitro* fertility test was accessed by embryo *in*

vitro production (IVP), ovaries from slaughterhouses were used, embryo development classification and sperm motility were promoted during the process. Results indicate that sperm protection is similar between LE and GO extenders. However the antioxidant supplementation of soybean lecithin-based extender is a great alternative to improve the process of sperm protection, since pregnancy rate of LA and LS groups was satisfactory for a TAI program. Besides, LS group presented the best results on IVP process. In conclusion, soybean lecithin-based extender supplemented with superoxide dismutase would be a better option for a definite replacement of egg yolk-based extender for sperm bovine cryopreservation.

Keywords: Antioxidant. Ascorbic acid. Egg yolk. Semen extender. Superoxide dismutase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Formação das espécies reativas de oxigênio.....	32
Figura 2- Reação de Fenton	38
Figura 3- Mecanismo de ação do sistema enzimático de proteção antioxidante	39
Figura 4- Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais	51
Figura 5- Representação gráfica dos grupos experimentais: diluidores	57
Figura 6- Representação esquemática do protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo	64
Figura 7- Representação esquemática das amostras seminais e grupos experimentais para o teste de fertilização <i>in vitro</i>	65
Figura 8- Representação esquemática da disposição de cada grupo estudado nas microgotas para fertilização <i>in vitro</i>	67
Figura 9- Representação do desenvolvimento do processo de fertilização <i>in vitro</i>	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Médias $\pm$ erros padrão da média da morfologia de espermatozoide bovino criopreservado nos diferentes diluidores – Paraguai – 2011	71
Tabela 2- Médias $\pm$ erros padrão da média dos defeitos de espermatozoide bovino criopreservado nos diferentes diluidores – Paraguai – 2011	72
Tabela 3- Médias $\pm$ erros padrão da média da integridade de membranas de espermatozoide bovino criopreservado nos diferentes diluidores – Paraguai – 2011	73
Tabela 4- Médias $\pm$ erros padrão da média do potencial mitocondrial de espermatozoide bovino criopreservado nos diferentes diluidores – Paraguai - 2011	74
Tabela 5- Médias $\pm$ erros padrão da média da suscetibilidade ao estresse oxidativo induzido e desnaturação da cromatina de espermatozoide bovino criopreservado nos diferentes diluidores – Paraguai - 2011..	75
Tabela 6- Médias $\pm$ erros padrão da média da análise computadorizada da motilidade (CASA) de espermatozoide bovino criopreservado nos diferentes diluidores – Paraguai - 2011	76
Tabela 7- Porcentagem de prenhez de vacas inseminadas em tempo fixo com amostra espermática bovina criopreservada nos diferentes diluidores – Paraguai – 2011	77
Tabela 8- Porcentagem de estruturas embrionárias no teste <i>in vitro</i> de amostra espermática bovina criopreservada nos diferentes diluidores – Cravinhos - SP – 2012	78
Tabela 9- Médias $\pm$ erros padrão da média da motilidade espermática durante o teste de fertilidade <i>in vitro</i> de amostra espermática bovina criopreservada nos diferentes diluidores – Cravinhos - SP – 2012.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ácido ascórbico
DNA	ácido desoxirribonucléico
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
ATP	adenosina trifosfato
ALH	amplitude do deslocamento lateral de cabeça
O ₂ ⁻	ânion superóxido
AOX	antioxidante
cm	centímetro
CCO	citocromo C-oxidase
Cu ⁺	cobre
POPE	coloração simples
CASA	“Computer Assisted Semen Analysis”
CIV	cultivo <i>in vitro</i>
DAB	3’3 – diaminobenzidina
DHA	docosahexaenóico
E/N	eosina-nigrosina
ROS	espécies reativas de oxigênio
sptz	espermatozoide
Fe ²⁺	ferro
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
BCF	frequência de batimentos espermáticos
CO ₂	gás carbônico
GSH	glutathione
g	gravidade
NaOH	hidróxido de sódio
IATF	inseminação artificial em tempo fixo
LA	laranja de acridina
LIN	linearidade
LDL	lipoproteína de baixa densidade
MDA	malondialdeído
MIV	maturação <i>in vitro</i>
µg	micrograma
µL	microlitros

μM	micromolar
mg	miligramas
mL	mililitros
mm	milímetro
mM	milimolar
MOT	motilidade
PROG	motilidade progressiva
ng	nanograma
nm	nanômetro
r	nível de correlação
P	nível de significância
$\text{NO}^{\cdot}$	óxido nítrico
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
$\text{OONO}^{\cdot}$	peroxinitrito
BSP	plasma seminal bovino
pH	potencial de hidrogeniônico
PIV	produção <i>in vitro</i>
$\text{OH}^{\cdot}$	radical hidroxila
STR	retilinearidade
SFB	soro fetal bovino
SCSA	“Sperm Chromatin Structure Assay”
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
SOD	superóxido dismutase
PBS	tampão-fosfato-salino
UI	unidades internacionais
VCL	velocidade curvilinear
VAP	velocidade de trajeto
VSL	velocidade progressiva
VS	“versus”

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
=	igual
>	maior que
+	mais
$\pm$	mais ou menos
®	marca registrada
<	menor que
10^6	milhões
:	para (1:100)
%	porcentagem
x	vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Efeitos da criopreservação sobre a qualidade espermática	26
2.2 Meios para criopreservação de sêmen bovino	28
2.2.1 <i>Gema de ovo.....</i>	29
2.2.2 <i>Lecitina de soja</i>	30
2.3 Ação das espécies reativas de oxigênio sobre os espermatozoides	32
2.4 Atividade antioxidante na proteção espermática	34
2.4.1 <i>Antioxidantes</i>	35
2.4.2 <i>Ácido ascórbico (AA)</i>	36
2.4.3 <i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	38
2.5 Avaliações e teste de fertilidade do espermatozoide bovino	39
2.5.1 <i>Avaliações do espermatozoide bovino</i>	40
2.5.2 <i>Teste de fertilidade – Inseminação artificial em tempo fixo (IATF).....</i>	42
2.5.3 <i>Teste de fertilidade - Produção in vitro de embriões (PIV)</i>	44
3 HIPÓTESE	46
4 OBJETIVOS	48
5 MATERIAIS E MÉTODOS	50
5.1 Experimento 1 – Avaliação e criopreservação de amostras espermáticas bovinas	52
5.1.1 <i>Locais</i>	52
5.1.2 <i>Etapa 1- Colheita e avaliação de amostras espermáticas e seleção dos reprodutores ...</i>	52
5.1.3 <i>Etapa 2- Diluição e criopreservação de amostras espermáticas bovinas</i>	55
5.1.4 <i>Etapa 3- Descongelação e avaliação de amostras espermáticas bovinas</i>	58
5.2 Experimento 2 – Avaliação da fertilidade <i>in vivo</i> de amostras espermáticas bovinas...	62
5.2.1 <i>Local.....</i>	62
5.2.2 <i>Inseminação artificial em tempo fixo</i>	63
5.2.3 <i>Diagnóstico de gestação</i>	64

5.3 Experimento 3 – Avaliação da fertilidade <i>in vitro</i> de amostras espermáticas bovinas..	64
5.3.1 Local	64
5.3.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões	65
5.3.3 Classificação embrionária	67
5.3.4 Avaliação da motilidade espermática	68
5.4 Análises Estatísticas	69
6 RESULTADOS	70
6.1 Resultados – Experimento 1 – Avaliação e criopreservação de amostras espermáticas bovinas	71
6.2 Resultados – Experimento 2 – Avaliação da fertilidade <i>in vivo</i> de amostras espermáticas bovinas	77
6.3 Resultados – Experimento 3 – Avaliação da fertilidade <i>in vitro</i> de amostras espermáticas bovinas	77
7 DISCUSSÃO	80
7.1 Discussão - Experimento 1 – Avaliação e criopreservação de amostras espermáticas bovinas	81
7.1.1 Efeito dos diluidores na criopreservação espermática	81
7.1.2 Efeito do ácido ascórbico na criopreservação espermática	88
7.1.3 Efeito da superóxido dismutase na criopreservação espermática	92
7.2 Discussão – Experimento 2 – Avaliação da fertilidade <i>in vivo</i> de amostras espermáticas bovinas	96
7.3 Discussão – Experimento 3 – Avaliação da fertilidade <i>in vitro</i> de amostras espermáticas bovinas	98
7.4 Considerações finais	103
8 CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	107

Introdução

"A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmos-nos sempre depois de cada queda"

Confúcio

1 INTRODUÇÃO

O Brasil encontra-se alocado no patamar de grande produtor mundial de proteína animal, com estimativa de produção total de 24,5 milhões de toneladas de carne em 2010 (BRASIL, 2013).

Atualmente, o rebanho bovino brasileiro está constituído de pouco mais de 211 milhões de cabeças de gado, posicionando o país como maior rebanho comercial do mundo, além disso, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países (IBGE, 2012).

Segundo previsões da Coordenação Geral de Planejamento Estratégico, da Assessoria de Gestão Estratégica (AGE), do Ministério da Agricultura, as exportações brasileiras de carne bovina representarão cerca de 60% do comércio mundial em 2018/2019 (BRASIL, 2013).

Dessa maneira, a crescente demanda por proteína animal, somada à grande importância econômica que a criação bovina exerce sobre o país, vem exigindo sistemas de produção cada vez mais eficientes. Dentro dos principais sistemas que garantem a produção bovina, destaca-se a reprodução, responsável pela manutenção da fertilidade animal e disseminação de genética de qualidade.

Bioteχνologias reprodutivas como a criopreservação espermática, inseminação artificial em tempo fixo, fertilização *in vitro* e transferência de embriões são as principais responsáveis para o aumento da produtividade do rebanho bovino brasileiro. Por isso, é notável o aumento acelerado da realização de colheita e processamento de material genético animal em propriedades rurais, para uso exclusivo em rebanho próprio. O que exige técnicas de análise e criopreservação espermáticas, passíveis de serem realizadas a campo.

Ademais, uma das maiores limitações da aplicação dessas biotecnologias é a perda de parte da qualidade espermática após a criopreservação. Esse processo, apesar de muito

utilizado, causa danos estruturais e subestruturais nos espermatozoides, o que reduz sua viabilidade e potencial fecundante (FOROUZANFAR et al., 2010).

O diluidor é o responsável por fornecer proteção adequada e conservar a integridade e função da célula espermática durante as mudanças de temperatura e osmolaridade no processo de criopreservação. No decorrer dos últimos 60 anos, diversos estudos foram desenvolvidos na busca do melhor diluidor ao sêmen de diversas espécies animais, sendo os constituídos de gema de ovo os que apresentaram melhores resultados ao sêmen bovino (BERGERON; MANJUNATH, 2006; CELEGHINI et al., 2008; DEL VALLE et al., 2012).

Atualmente muito vem sendo discutido sobre o uso de gema de ovo nos diluidores, já que esse produto, quando não pasteurizado, introduz um grande risco de contaminação microbiológica. Além disso, possui grande variabilidade em sua composição por se tratar de um produto de origem animal (GIL et al., 2003).

Uma série de análises quantitativas e qualitativas foi realizada para detectar contaminação microbiológica, onde os resultados foram contaminação acentuada em diluidores à base de gema de ovo e nenhum crescimento bacteriano em diluidor desenvolvido com lecitina de soja (BOUSSEAU et al., 1998). Essas características conduziram à substituição da gema de ovo por produtos de origem vegetal, como por exemplo, a lecitina de soja, que apesar de amplamente utilizada, ainda não exerce tão boa proteção espermática durante a criopreservação (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000).

Segundo Thun, Hurtado e Jannet (2002) a menor eficiência de diluidores à base de lecitina de soja está relacionada ao fato deste apresentar menor quantidade de moléculas de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Essas moléculas são atacadas pelas espécies reativas de oxigênio e sofrem peroxidação lipídica e, quando em concentração adequada, elas evitam o ataque das espécies reativas de oxigênio na membrana espermática, protegendo a célula contra a peroxidação lipídica.

Sabendo-se que um dos responsáveis pelas injúrias espermáticas durante a criopreservação é o estresse oxidativo, esse poderia ser controlado pela adição de antioxidantes aos diluidores (BILODEU et al., 2000). Há duas classes de antioxidantes, os enzimáticos e não-enzimáticos, como representantes de cada grupo pode-se citar a superóxido dismutase (SOD) e o ácido ascórbico ou vitamina C (NISSEN; KREYSEL, 1983), dos

quais já se têm relato de manutenção da qualidade espermática durante a criopreservação em diversas espécies animais (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999a; SILVA et al., 2011; CHATDARONG et al., 2012).

Frente a essa realidade, é de extrema importância desenvolver meios de manutenção dos gametas masculinos que permitam a padronização de sua composição, não introduzam riscos sanitários e garantam maior fertilidade da amostra espermática bovina criopreservada.

Revisão de Literatura

"Ser homem é ser responsável. É sentir que colabora na construção do mundo."

Antoine de Saint-Exupéry
Trecho de "O Pequeno Príncipe"

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Efeitos da criopreservação sobre a qualidade espermática

A disponibilidade de gametas viáveis e funcionalmente normais é um pré-requisito para o sucesso da fertilização em mamíferos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (PARKS, 1997). Por isso a criopreservação espermática vem sendo amplamente usada como ferramenta em sistemas de produção de bovinos, como disseminadora de genética e armazenamento de genoma. Além disso, esse procedimento tornou-se essencial para a aplicação de diversas tecnologias, já que elimina as limitações de tempo e espaço (BUCAK et al., 2010).

O sucesso da criopreservação do sêmen depende da manutenção da integridade e funcionalidade das estruturas espermáticas e, conseqüentemente, do seu potencial fertilizante. Sendo assim, suas estruturas como flagelo, mitocôndria, núcleo, DNA, membranas acrossomal e plasmática devem ter suas características fisiológicas mantidas após a descongelação (MEDEIROS et al., 2002).

O responsável por preservar essas características espermáticas é o mecanismo de interação entre diluidor, crioprotetor, curvas de refrigeração, congelação e descongelação. Apesar dessa interação, a criopreservação, ainda é um tanto quanto prejudicial às funções espermáticas podendo conduzir a alterações funcionais e estruturais e danos subletais aos espermatozoides, prejudicando sua função e seu potencial de fertilização (PERIS et al., 2007). Apesar de muitos estudos serem conduzidos no sentido de evitar essas crio-injúrias, ainda não foi encontrado método ou diluidor que sejam altamente eficientes para prevenir tais danos (MEDEIROS et al., 2002; CRESPILO et al., 2012).

Para alcançar sucesso nos programas reprodutivos, os espermatozoides devem reter pelo menos quatro atributos básicos após a congelação e descongelação: 1. Integridade do flagelo, que garante produção de ATP e motilidade; 2. Integridade do núcleo, que mantém estável o armazenamento do DNA; 3. Integridade do acrossomo, já que possui enzimas

responsáveis pela fecundação; 4. Integridade de membrana plasmática, importante para a sobrevivência do espermatozoide dentro do trato reprodutivo feminino e para a ligação do mesmo com a membrana do oócito durante a fertilização (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990).

Apesar do mecanismo que causa os danos celulares ser considerado multifatorial (formação de cristais de gelo, alterações nos lipídeos de membranas e na osmolaridade), alguns autores relatam como causa da perda de função espermática após a criopreservação, o estresse oxidativo (GADEA et al., 2004). Os principais danos causados nas células espermáticas pela alteração de temperatura durante o processo da criopreservação são redução da motilidade celular, comprometimento da integridade de membrana plasmática, alteração de estrutura e atividade acrossomal e redução da viabilidade celular (O'CONNELL; MCCLURE; LEWIS, 2002).

A explicação para tais efeitos deletérios à célula está relacionada com a fase de transição dos lipídeos de membrana, resultando na perda de seletividade, característica das membranas biológicas de células vivas, além da pequena quantidade de citoplasma e consequentemente de antioxidantes dos espermatozoides. As mudanças de temperatura sofridas durante o processo de criopreservação produzem alterações físicas na membrana que passa do estado líquido ao estado semi-sólido devido ao encontro aleatório das cadeias de ácidos graxos e disposição paralela, alterando para uma estrutura rígida, com regiões frágeis e susceptíveis a rupturas e maior permeabilidade de íons (HOLT, 2000).

A principal característica das membranas biológicas é o arranjo dos lipídeos em dupla camada, a composição lipídica nas células espermáticas de mamíferos é diferente da composição das células somáticas, os espermatozoides contêm maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados em sua membrana plasmática, responsáveis por proporcionar maior fluidez e permeabilidade, o que facilita a motilidade celular, porém servem como substrato aos radicais livres, tornando-a mais susceptível ao processo de peroxidação lipídica. Assim sendo, autores afirmaram que a membrana plasmática é o alvo primário dos danos causados pela criopreservação (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989).

Na monta natural, o sêmen é ejaculado no interior do sistema reprodutivo da fêmea, que além de não ter contato com oxigênio, os espermatozoides recebem proteção do fluido

presente no oviduto, que é rico em taurina. Essa proteína é importante para proteção contra a ação das espécies reativas de oxigênio. Assim, ao ser manipulado para a criopreservação, o sêmen entra em contato com o oxigênio, fator que gera aumento na produção de espécies reativas de oxigênio ou ROS (BAUMBER et al., 2003).

Muitos diluidores vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de evitar essas crio-injúrias e reduzir danos celulares causados pela peroxidação lipídica dessas células. Uma alternativa é a adição de antioxidantes em diluidores rotineiramente utilizados, que mostrou significativa melhora na qualidade de amostra espermática criopreservada de diferentes espécies animais (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999; GROSSFELD et al., 2008).

2.2 Meios para criopreservação de sêmen bovino

Recentemente, determinar um meio ótimo para a criopreservação das células espermáticas bovinas tem sido a meta de algumas pesquisas (PAPA et al., 1998; TRIMECHE et al., 1999). Durante os últimos 60 anos, muito se discutiu sobre o meio usado para diluir e estocar o sêmen de diversas espécies animais, porém os componentes básicos permanecem sendo gema de ovo e leite como fontes de lipoproteínas (BERGERON; MANJUNATH, 2006).

Por um lado, esses componentes fornecem excelente proteção à membrana contra o choque frio, por outro, introduzem grande risco de contaminação microbiológica (POLGE; ROWSON, 1952). A adição de componentes de origem animal à maioria dos diluidores comerciais usados para a congelação de sêmen bovino representa um risco potencial de contaminação das amostras por bactéria ou micoplasma (BOUSSEAU et al., 1998). Além disso, por se tratarem de produtos de origem animal, podem apresentar grande variabilidade em sua composição (AIRES et al., 2003).

Para reduzir esse risco sanitário, o uso de diluidores processados industrialmente, pasteurizados e microbiologicamente monitorados, constitui boa alternativa para maior

segurança, uniformidade na criopreservação, importação e exportação de sêmen bovino (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000).

Uma série de análises quantitativas e qualitativas foi realizada para detectar o grau de contaminação microbiológica nos diluidores à base de gema de ovo e lecitina de soja. O diluidor que continha produto de origem animal apresentou contaminação bacteriana moderada (unidades formadoras de colônia: 10 a 60/mL), enquanto que nenhuma contaminação foi encontrada naquele que continha lecitina de soja (BOUSSEAU et al., 1998).

Por isso já é uma realidade a utilização de diluidores à base de lecitina de soja para criopreservação tanto de células animais quanto humanas (FUKUI et al., 2008; FOROUZANFAR et al., 2010).

2.2.1 Gema de ovo

Segundo Moussa et al. (2002), o componente mais efetivo presente nos diluidores à base de gema de ovo são as lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Tais lipoproteínas protegem de várias maneiras os fosfolipídios de membrana durante o processo de criopreservação. Uma forma seria que essas LDLs fossem atacadas em maior quantidade pelas ROS, evitando a peroxidação dos fosfolipídios de membrana (THUN; HURTADO; JANETT, 2002).

Estudos acerca da composição do plasma seminal de bovinos revelaram a presença de famílias de proteínas, classificadas como proteínas-BSP (*Bovine Seminal Plasma*), que representam cerca de 70% das proteínas totais do plasma seminal de bovinos (MANJUNATH; SAIRAM; UMA, 1987). Essas proteínas-BSP possuem um importante papel na função espermática ao se ligarem aos lipídeos da membrana plasmática (colesterol e fosfolipídios) e induzirem o efluxo desses componentes para que ocorra a capacitação celular.

No entanto, o contato permanente dessas proteínas do plasma seminal ao espermatozoide prejudica o processo de criopreservação das amostras seminais de bovinos,

já que continuamente mantém essa remoção de colesterol, importante para proteção contra os danos do congelamento (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002).

Em estudos posteriores, esse mesmo grupo de pesquisadores verificou que as proteínas-BSP se ligam à lipoproteína de baixa densidade (LDL), presente na gema de ovo do diluidor. Na realidade, uma única molécula de LDL pode se ligar em 240 a 555 moléculas de proteínas-BSP, o que faz dos diluidores à base gema de ovo o melhor produto para a criopreservação de sêmen bovino (MANJUNATH et al., 2002).

Normalmente há melhor efeito crioprotetor em diluidores à base de gema de ovo, sendo considerado o diluidor que melhor protege a célula espermática do choque frio (WATSON, 1981). O diluidor comercial Triladyl® (gema de ovo) aumentou a taxa de fertilização após a inseminação de ovelhas, em comparação com diluidores à base de lactose e sacarose (PURDY, 2006).

Em conclusão de Karabinus, Evenson e Kaproth (1991) a proteção da membrana plasmática, manutenção da atividade mitocondrial e integridade de cromatina das células espermáticas dependem da escolha dos diluidores, sendo o melhor resultado obtido com o uso do diluidor tris-gema em relação ao diluidor à base de leite.

Apesar da eficiência comprovada do efeito do diluidor à base de gema de ovo sobre a qualidade espermática e da possibilidade de pasteurização desse produto, sua substituição por um produto que não seja de origem animal seria o mais indicado (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000).

2.2.2 Lecitina de soja

A lecitina é uma fosfatidilcolina poli-insaturada, que contém componentes básicos para as funções energéticas e estruturais de todas as membranas biológicas. São indispensáveis para os mecanismos de diferenciação, proliferação e regeneração celular. A lecitina pode ser extraída dos grãos de soja, sendo uma mistura complexa de fosfolípidos,

triglicerídeos e outras substâncias derivadas dos processos de refinamento do óleo (SEIDMAN et al., 2002).

A menor eficiência de diluidores à base de lecitina de soja sobre a criopreservação de sêmen bovino foi explicada pelo fato de que a quantidade de LDL presente em sua composição não seja suficiente para ligar-se à maioria das moléculas de proteínas-BSP e sofrer a peroxidação lipídica sem que as lipoproteínas de membrana estejam envolvidas (THUN; HURTADO; JANETT, 2002).

Muitos autores compararam diluidores seminais à base de gema de ovo e lecitina de soja em diferentes espécies animais, um deles foi Hiwasa et al. (2009), que observaram queda significativa na taxa de prenhez em ovelhas inseminadas com sêmen refrigerado com lecitina de soja.

O diluidor comercial Bioxcell[®] (lecitina de soja) também se mostrou inferior ao diluidor leite-gema em preservação de sêmen ovino refrigerado (KULAKSIZ; CEBL; AKCAY, 2012). Em estudo com sêmen bovino foi comparado gema de ovo e lecitina de soja no crioprotetor, o grupo lecitina de soja além de mostrar piores resultados nas análises laboratoriais como motilidade, porcentagem de células rápidas e linearidade, a taxa de fertilidade à campo também foi menor (CRESPILHO et al., 2012).

Poucos foram os autores que descreveram bons resultados sobre qualidade espermática após a criopreservação com diluidor lecitina de soja. Foi verificado, em ovinos, taxa de prenhez semelhante após a inseminação artificial usando diluidores gema de ovo, albumina sérica bovina e Anromed[®] (lecitina de soja) (FUKUI et al., 2008).

Apesar da lecitina de soja representar uma alternativa para o desenvolvimento de diluidores seminais quimicamente definidos e livres de contaminação biológica, os diluidores preparados com gema de ovo seguem sendo mais eficientes na criopreservação de células espermáticas bovinas e na manutenção da fertilidade (CRESPILHO et al., 2012).

Dessa maneira, é possível observar que a menor qualidade dos diluidores à base de lecitina de soja está associada ao maior nível de estresse oxidativo e peroxidação lipídica sofrida pelas células, sendo essencial encontrar uma alternativa que bloqueie ou reduza esses efeitos.

2.3 Ação das espécies reativas de oxigênio sobre os espermatozoides

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são substâncias químicas altamente reativas formadas a partir da reação de redução das moléculas de oxigênio. Podemos citar como ROS mais importantes as seguintes substâncias: óxido nítrico ($\text{NO}^\cdot$), ânion superóxido ($\text{O}_2^\cdot$), radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CHAN; CHOW; CHIU, 1999).

Moléculas de oxigênio reagem com radicais livres, substâncias que apresentam elétrons não pareados na camada de valência, formando o ânion superóxido, produto primário do sistema de geração de ROS, por sua vez, ele sofre a reação de dismutase (recebe hidrogênio e elétrons) e dá origem ao peróxido de hidrogênio, que após sofrer redução de metais de transição (ferro Fe^{2+} ou cobre Cu^+) forma o radical hidroxila, considerado como a ROS que causa mais danos aos sistemas biológicos devido a sua alta reatividade com biomoléculas. O óxido nítrico reage facilmente com outros radicais livres, quando se encontra em grande quantidade com o $\text{O}_2^\cdot$ ocorre a produção de peroxinitrito ($\text{OONO}^\cdot$), altamente citotóxico (HALLIWELL, 1991) (Figura 1).

Figura 1 – Formação das espécies reativas de oxigênio

Fonte: Adaptado de Chabot et al. (1998).

As ROS podem atacar qualquer componente celular, porém, os ácidos graxos poli-insaturados são os principais alvos por possuírem grandes quantidades de duplas ligações, as insaturações (IWASAKI; GAGNON, 1992).

O processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de ROS, que ao ter contato com os ácidos graxos poli-insaturados da membrana plasmática dos espermatozoides, retiram uma molécula de hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical

livre, que por sua vez, irá agir em outro ácido graxo poli-insaturado. Este mecanismo desencadeia a cascata de peroxidação, causando alterações estruturais espermáticas, além da perda de fluidez e da capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático, mudanças no metabolismo celular chegando a significativos danos no material genético (MARQUES et al., 2002).

Essas espécies reativas estão envolvidas em funções espermáticas essenciais, tais como função cinética, que permite a movimentação espermática através do aparato reprodutivo da fêmea, função fusogênica, que promove a capacitação, hiperativação, reação acrossômica e a ligação espermática à zona pelúcida, além de promover a estabilização da cápsula mitocondrial na peça intermediária de espermatozoides bovinos (GONÇALVES et al., 2010).

Diversos trabalhos expuseram o importante papel das ROS nos processos de capacitação, reação acrossomal e hiperativação espermática, onde verificaram que após a adição de ROS e de antioxidantes ao meio, esses processos eram desencadeados ou bloqueados, respectivamente (LAMIRANDE; LECLERC; GAGNON, 1997; HERRERO; LAMIRANDE; GAGNON, 2003).

Todo o mecanismo desses processos, ainda não está totalmente elucidado, porém, sabe-se que uma das vias da capacitação espermática tem início com a formação das espécies reativas de oxigênio, principalmente o $O_2^{\cdot -}$, a partir da reação de oxidação na membrana plasmática. O alvo das ROS é a enzima adenil ciclase, que uma vez estimulada, produz o AMPcíclico. Este AMPc ativa a proteína quinase A para fosforilar determinados substratos que ao final promovem as alterações celulares referentes a todos esses processos celulares, essenciais para a fertilização (O'FLAHERTY; LAMIRANDE; GAGNON, 2006).

O excesso de estresse oxidativo induzido por essas espécies reativas de oxigênio implica na fisiopatologia de diversos problemas orgânicos, como por exemplo, doenças cardiovasculares, aterosclerose, problemas neurológicos, doenças autoimunes, diabetes e infertilidade (BAFANA et al., 2011). Diferentes estudos demonstraram que a alta produção de ROS está associada com oligoastenozoospermia e pouco potencial fertilizante do sêmen humano (ZINI; LAMIRANDE; GAGNON, 1993). Esses mesmos autores detectaram grande

quantidade de ROS em 40% dos homens inférteis estudados, enquanto em homens férteis essa quantidade foi quase nula (MURAWSKI et al., 2007).

Os danos causados pelo estresse oxidativo são resultados de desequilíbrio entre a produção excessiva de ROS e a falta de sistemas antioxidantes. Dessa maneira, é considerado como uma das causas mais frequentes da disfunção espermática (AITKEN et al., 1998). Além disso, é um dos principais fatores associados à perda na fertilidade de amostras de sêmen durante sua manipulação e armazenamento, principalmente quando utilizadas técnicas que necessitam a retirada do plasma seminal (AITKEN; BAKER, 2002).

Dessa forma, o excessivo efeito das ROS pode ser limitado pela presença de vários sistemas antioxidantes, que envolvem o tipo enzimático e não-enzimático. Esses sistemas de defesa são responsáveis por manter o balanço entre a produção e o metabolismo dessas substâncias e ainda agir em todas as etapas no processo de peroxidação (NISSEN; KREYSEL, 1983).

2.4 Atividade antioxidante na proteção espermática

A defesa antioxidante primária que protege o espermatozoide da ação das espécies reativas de oxigênio e da peroxidação lipídica é de origem citoplasmática. No entanto as células espermáticas descartam grande parte de seu citoplasma durante o processo de diferenciação, perdendo junto, grande quantidade de antioxidante. Isso faz com que essas células sejam mais sensíveis ao estresse oxidativo (AITKEN; FISHER, 1994).

As células espermáticas de mamíferos sendo ricas em ácidos graxos poli-insaturados em sua membrana plasmática e deficientes em antioxidantes citoplasmáticos são naturalmente mais susceptíveis a peroxidação lipídica. Essas características conferem a redução da integridade de suas membranas, diminuição funcional, perda de integridade genômica e de motilidade (BUCAK et al., 2007).

Em contrapartida, para suprir a escassez de antioxidante celular e proteger contra os efeitos das ROS, o plasma seminal possui sistemas antioxidantes que desenvolvem papel importante na manutenção espermática (AITKEN; BAKER, 2002).

2.4.1 Antioxidantes

Os antioxidantes são agentes que quebram a cascata da peroxidação lipídica e diminuem a ocorrência do estresse oxidativo, garantindo a qualidade espermática. Três enzimas constituem um dos sistemas de proteção antioxidante espermático: catalase, a qual permite a degradação do peróxido de hidrogênio; glutathione peroxidase, que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos; e superóxido dismutase, que acelera a dismutação do ânion superóxido (NISSEN; KREYSEL, 1983).

Do sistema de proteção não-enzimático, fazem parte: a vitamina-E (α -tocoferol), que atua sobre a membrana plasmática do espermatozoide e interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica; a vitamina-C (ácido ascórbico), que atua na fase aquosa da célula e entre outras funções regenera a vitamina-E, de oxidada para ativa, e neutraliza o ânion superóxido e oxigênios livres; a glutathione (GSH); o urato; o piruvato; a taurina; a hipotaurina e o beta caroteno (DAWSON et al., 1992; AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006).

Um antioxidante que reduza o estresse oxidativo e aumente a qualidade espermática pode ser útil no manejo da infertilidade masculina (BANSAL; BILASPURI, 2010), por isso, na tentativa de suprir a quantidade limitada de antioxidante espermático, ultimamente, têm sido adicionados antioxidantes ao meio de manutenção e criopreservação de sêmen bovino e o efeito tem sido benéfico contra o ataque das ROS, preservando a qualidade seminal e garantindo a fertilidade de amostras criopreservadas (BILODEAU et al., 2001).

2.4.2 Ácido ascórbico (AA)

A vitamina-C é um antioxidante solúvel em água, podendo ser facilmente encontrado nas células animais. Protege o espermatozoide dos danos causados pelos radicais livres, garantindo sua motilidade e viabilidade (VERMA; KANWAR, 1998).

Sendo secretado pelas glândulas sexuais no momento da ejaculação, o ácido ascórbico representa a primeira linha de defesa antioxidante no plasma seminal, contribuindo com aproximadamente 65% de toda a ação antioxidante. Esse antioxidante está presente no sêmen em concentrações dez vezes maiores que sua concentração no plasma sanguíneo, demonstrando sua grande importância para a fertilidade masculina (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999b).

O mecanismo de ação antioxidante da vitamina-C ocorre por sua capacidade redutora como doadora de elétron. Tal vitamina é chamada de antioxidante, pois ao doar seus elétrons previne que outros compostos sejam oxidados. No entanto, a vitamina-C ao ser oxidada pelas ROS forma o radical ascorbil, que apesar de ser um radical livre, é menos reativo e menos prejudicial (BIELSKI; RICHTER; CHAN, 1975).

Outro importante mecanismo de ação da vitamina-C é como recuperador da vitamina-E. O α -tocoferol ao ser oxidado por uma espécie reativa de oxigênio forma o radical α -tocoferoxil, que por sua vez é reduzido pelo ascorbato em sua forma original de α -tocoferol (NEUZIL; THOMAS; STOCKER, 1997). Atua também prevenindo a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo a célula dos danos oxidativos (NORDBERG; ÁRNER, 2001).

Além disso, o ácido ascórbico protege o DNA contra a oxidação, sugerindo que a proteção antioxidante adequada seja essencial para manter a integridade genética da célula espermática e minimizar o risco de mutação nas células germinativas. Tais alterações poderiam provocar defeitos congênitos, enfermidades genéticas e até mesmo formações tumorais nos descendentes (FRAGA et al., 1991).

Segundo Silva et al. (2007), a suplementação de diluidores espermáticos com a vitamina-C gera um efeito positivo sobre a funcionalidade espermática por reduzir os danos celulares pelo sistema contínuo de proteção contra os radicais livres. Ainda, Beconi et al. (1993), adicionaram 5mM de ácido ascórbico ao crioprotetor de sêmen bovino e afirmaram que o antioxidante protege eficientemente as células espermáticas durante o processo de congelação e descongelação.

Além disso, Sierens, Hartley e Campbell, em 2002, demonstraram que o ácido ascórbico atua na diminuição da oxidação do DNA, e das proteínas e lipídeos de membrana. O ácido ascórbico é um potente eliminador de espécies reativas de oxigênio, porém, foi verificado que ele exerceu seu efeito protetor da fertilidade, em estudo com cobaias, porém sem diminuir os níveis de malondialdeído no grupo tratado, devido a isso, uma hipótese interessante foi exposta por Jewo et al. (2012), sugerindo que o seu efeito protetor envolve mecanismos que vão além da atividade antioxidante.

Apesar de o ácido ascórbico ser eficiente na sua função antioxidante, quando em altas concentrações assume o papel de pró-oxidante, pois alimenta a reação de Fenton (Figura 2) e potencializa a cascata da peroxidação lipídica (FRAGA et al., 1991). A participação na reação de Fenton é um processo fisiológico, e essencial às funções espermáticas, porém, quando em grande quantidade, ocorre o desequilíbrio entre a produção de ROS e a ação antioxidante, o que desencadeia distúrbios orgânicos como a inibição da estereidogênese, declínio da fertilidade e aumento de ocorrência de alterações genéticas (LEVINE; MORITA, 1985).

Corroborando, a adição de AA na dose de 20 μ M a 600 μ M em amostras seminais de homens normozoospermicos e astenozoospermicos, mostrou diminuição na motilidade espermática (DONELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999a). Por isso existe a grande necessidade de determinar a concentração ideal de antioxidante antes de iniciar um tratamento com suplementação de antioxidantes, seja ele enzimático ou não enzimático.

Figura 2 – Reação de Fenton

Fonte: Adaptado de Nordeberg e Arnér, 2001.

2.4.3 Superóxido dismutase (SOD)

As superóxido dismutases foram as primeiras enzimas metabolizantes de ROS a serem descobertas (ALVAREZ et al., 1987). Segundo Matés (2000), essas enzimas são classificadas em três tipos: superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), superóxido dismutase citosólica (CuZn-SOD) e superóxido dismutase extracelular (EC-SOD).

No mecanismo de defesa contra as ROS, a reação catalisada pela SOD baseia-se na dismutação de duas moléculas de ânion superóxido (O_2^-) com a formação de uma molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e uma molécula de oxigênio (O_2). Estes, por sua vez, podem ser destruídos pela catalase ou pela glutathione peroxidase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Tal reação evita a formação do radical hidroxila ($OH^\cdot$), a ROS mais prejudicial ao espermatozoide (HALLIWELL, 1991) (Figura 3).

Segundo Bafana et al. (2011), a infertilidade em homens está diretamente relacionada com a falta de SOD no organismo e essa enzima pode ser usada, local e sistemicamente, para o tratamento de diversas enfermidades desencadeadas pelo estresse oxidativo.

Figura 3 – Mecanismo de ação do sistema enzimático de proteção antioxidante

Fonte: Adaptado de Halliwell e Gutteridge, 1989.

A atividade natural de SOD foi dosada em amostras seminais de homens férteis e inférteis e ao comparar esses dois grupos verificou-se que a atividade de SOD foi significativamente maior no grupo de homens férteis (0,542 vs 0,338). Além disso, observou-se correlação positiva entre a atividade de SOD e a qualidade espermática pela avaliação da motilidade e concentração (MURAWSKI et al., 2007).

Em estudo de Nichi (2009) foi testado o efeito de diferentes antioxidantes em diversas concentrações sobre as características de sêmen de epidídimo bovino, e os melhores resultados foram observados naquelas amostras seminais criopreservadas com a adição de ácido ascórbico (4,5mM) ou superóxido dismutase (60UI/mL).

Há alguns anos, tem sido demonstrado que a suplementação dos diluidores seminais com antioxidantes aumentou o efeito protetor contra as crio-injúrias sofridas pelas células espermáticas de bovinos, ovinos, caprinos, suínos, caninos e também humanos, no entanto, a adição desses agentes em altas concentrações pode acarretar efeitos controversos, como bloqueio das reações: acrossomal, hiperativação e capacitação espermática, e prejuízos no potencial fertilizante das amostras seminais (BALL; VO, 2001).

2.5 Avaliações e teste de fertilidade do espermatozoide bovino

2.5.1 Avaliações do espermatozoide bovino

A avaliação da célula espermática apresenta como objetivos principais verificar a funcionalidade celular e prever seu potencial de fertilidade, já que a maioria dos testes utilizados apresenta boa relação com indicadores de fertilidade (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993).

Assim sendo as amostras espermáticas devem apresentar não somente características mínimas de concentração, motilidade, morfologia adequada, integridade de membranas plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial e integridade de material genético, mas também, deve manter alta sua capacidade fertilizante para que possam ser consideradas amostras de boa qualidade (WALLACE, 1992).

O caráter móvel dos espermatozoides é uma variável de fácil avaliação e pode determinar com segurança seu estado fisiológico, é sabido que a boa motilidade é um componente central para a qualidade mínima aceitável de uma amostra seminal. Assim sendo, a avaliação computadorizada da motilidade é um exame de grande importância devido ao fato da cinética celular apresentar relevância na determinação do potencial de fertilidade de uma amostra espermática (CENTOLA, 1996; HOLT et al., 1997; JANUSKAUSKAS et al., 1999).

Dentre esses parâmetros, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com penetração no muco cervical, penetração em oócitos de hamster e resultados de fertilização *in vitro*. Também, em amostras espermáticas humanas, Hong et al. (1991) observaram que a taxa de migração trans-membrana apresentou alta correlação com as análises computadorizadas de motilidade total ($r = 0.83$), motilidade rápida ($r = 0.82$) e motilidade progressiva ($r = 0.85$).

A integridade das membranas plasmática e acrossomal do espermatozoide exerce papel fundamental tanto na sobrevivência celular no trato genital da fêmea, quanto para a manutenção da capacidade fertilizante (PARKS; GRAHAN, 1992). Tais estruturas são

responsáveis pela manutenção do equilíbrio osmótico e pela penetração do espermatozoide na zona pelúcida (SQUIRES et al., 1999).

Assim como a integridade estrutural das membranas, o potencial da atividade mitocondrial da célula espermática também exerce um papel fundamental na fertilização (KATO et al., 2001). Desse modo, é de grande importância aplicar técnicas seguras para o estudo das estruturas e funções espermáticas (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000).

Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e atividade mitocondrial existem desde técnicas contemporâneas mais avançadas como a citometria de fluxo, até colorações mais simples e antigas, que não exigem equipamentos específicos e são passíveis de serem facilmente aplicadas a campo. Um deles é o teste desenvolvido por Barth e Oko (1989), pelo qual, com o uso da coloração de eosina/nigrosina, é possível verificar a manutenção da seletividade da membrana plasmática e consequentemente sua integridade.

Além disso, a integridade acrossomal e atividade mitocondrial podem ser avaliadas, respectivamente, pela utilização dos corantes *fastGreen/rosa bengala* e 3,3'-diaminobenzidina (DAB), este último sendo, um ensaio citoquímico para demonstração qualitativa e quantitativa da atividade da enzima Citocromo C-oxidase (CCO), enzima da cadeia respiratória responsável pela produção de energia espermática (HRUDKA, 1987; POPE, ZHANG; DRESSER, 1991).

O DNA espermático possui importância vital sobre a célula. Alguns autores sugerem que esse fator é o marcador mais objetivo da função espermática juntamente com outros parâmetros como a morfologia (RAJESH et al., 2002). Segundo Karabinus, Evenson e Kaproth (1991), a estrutura da cromatina espermática é alterada durante a criopreservação, causando diminuição da área de superfície. Um dos diversos ensaios utilizados para a avaliação do DNA espermático é o *Sperm chromatin structure assay* (SCSA), responsável pela determinação qualitativa da integridade da cromatina espermática, definida pela suscetibilidade do DNA à desnaturação ácido-induzida *in situ* (LARSON et al., 2000).

Todas as estruturas e funções celulares, essenciais na capacidade fertilizante do espermatozoide, podem ser altamente afetadas pela degradação peroxidativa dos ácidos graxos poli-insaturados, o que leva à formação de produtos finais tóxicos como o 4-hidroxi-nonenal e o malondialdeído (MDA) (JONES; MANN; SHERINS, 1979). Dessa forma, a

dosagem dos produtos finais da peroxidação lipídica pode ser incluída entre as técnicas rotineiras de avaliação espermática. Já que altas concentrações de MDA apresentam correlação negativa com a motilidade espermática e com o sucesso no teste de penetração em oócito de hamster (AITKEN; BUCKINGHAM; HARKISS, 1993).

Apesar da grande importância a aplicação dos testes de avaliações espermáticas supracitados, a maneira mais eficiente de verificar a qualidade de uma amostra seminal é através da realização dos testes de fertilidade, podendo ser pela avaliação da fertilidade a campo ou pela utilização da técnica de produção *in vitro* de embriões.

2.5.2 Teste de fertilidade - Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

O desenvolvimento da inseminação artificial (IA) teve início a partir de melhorias no manejo dos machos aliado ao aprimoramento das técnicas de criopreservação espermática. Contudo, as falhas na detecção de estro e o grau de anestro pós-parto de rebanhos de diferentes partes do mundo prejudicam o uso dessa técnica, pois afetam negativamente a eficiência reprodutiva (BARUSELLI et al., 2004).

Para alcançar boa taxa de prenhez e facilitar o manejo das fêmeas bovinas para IA foram desenvolvidas técnicas para crescimento de folículos ovarianos, sincronização de cio, indução da ovulação e formação de corpo lúteo capaz de manter a gestação, tudo com a associação de compostos sintéticos com atividade hormonal, a chamada inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A IATF tem como estratégia de controle da ovulação provocar a luteólise com prostaglandina F₂ α , inibir a ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona, induzir a emergência de ondas foliculares e sincronizar a ovulação com aplicação de ésteres de estradiol (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995).

Atualmente, a “indústria” da inseminação artificial em tempo fixo se depara com dois desafios comuns, o controle da disseminação de enfermidades através dos meios de manutenção seminal e a obtenção de boa taxa de prenhez. O uso de diluidores seminais à

base de gema de ovo e leite é amplamente difundido, porém introduz um risco sanitário de contaminação microbiológica. Além disso, a preparação desses meios crioprotetores normalmente ocorre nas próprias centrais de inseminação artificial ou até mesmo a campo, o que dificulta sua manipulação (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000).

Por isso, nas últimas décadas, diversos estudos foram realizados a fim de comparar a eficiência de diluidores produzidos com produtos de origem animal e vegetal (CELEGHINI et al., 2008; ZAFFALON, 2009; CRESPILO et al., 2012). Em rebanho de animais da raça Nelore, cujas fêmeas foram inseminadas em tempo fixo, a taxa de concepção foi significativamente menor para o grupo que usou diluidor à base de lecitina de soja (30.43%), que para os grupos que usaram diluidores à base de gema de ovo (52.73%) ou TRIS (51.61%) (CRESPILO et al., 2012).

Comparando a eficiência de diluidores seminais à base de TRIS-gema e lecitina de soja, Van Wagtendonk-De Leeuw et al. (2000), também verificaram menor taxa de concepção nos animais inseminados com lecitina de soja (69,6%) em relação aos animais inseminados com TRIS-gema (73,6%). Ainda, foi verificada maior fertilidade à campo de amostras seminais criopreservadas com diluidor TRIS-gema-citrato que com Biociphos Plus® - lecitina de soja (THUN; HURTADO; JANETT, 2002). Sendo possível concluir que, apesar da lecitina de soja representar uma alternativa para o desenvolvimento de diluidores seminais quimicamente definidos e livres de contaminação biológica, a taxa de fertilidade ainda não supera a dos diluidores com gema de ovo em sua composição.

No entanto, em pesquisa realizada por Aires et al. (2003) foram comparados diluidores AndroMed® - lecitina de soja e TRIS-gema. Como resultados, não houve diferenças na capacidade espermática de ligação à zona pelúcida, a motilidade espermática pós-descongelção foi melhor em amostras diluídas com AndroMed® e nas avaliações à campo, a taxa de não retorno ao cio foi significativamente maior no grupo inseminado com AndroMed® (70,45% e 67,85%, respectivamente).

Outra investigação que também estudou o efeito de diluidores AndroMed®, TRIS-gema e Tris-BSA em sêmen ovino, demonstrou semelhança na taxa de prenhez, na integridade acrossomal e no teste de ligação a zona pelúcida entre os três diluidores (FUKUI et al., 2008).

2.5.3 Teste de fertilidade - Produção *in vitro* de embriões (PIV)

O Brasil também se posiciona como maior produtor de embriões *in vitro*, tendo aproximadamente 85% do mercado mundial. Nos últimos 12 anos, contudo, a PIV tornou-se inicialmente uma opção e, posteriormente, a técnica de eleição para a produção de embriões bovinos, principalmente em raças zebuínas (VIANA et al., 2010).

No Brasil, as prenhez com embriões produzidos *in vitro* tiveram início em 1993 (WATANABE et al., 1996). O processo de produção *in vitro* de embriões é, basicamente, resumido em três etapas: maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), para o desenvolvimento embrionário até os estágios de mórula ou blastocisto, etapas que antecedem a transferência ou criopreservação (LU et al., 1987).

O desenvolvimento embrionário é o processo compreendido desde a união oócito-espermatozoide até a formação do blastocisto. Isso inclui a primeira clivagem, fase crítica para determinar o desenvolvimento subsequente do embrião; a ativação do genoma embrionário, no estágio entre 8 e 16 células; a compactação da mórula no dia 5; e a formação do blastocisto entre os dias 6 e 7 de desenvolvimento (LONERGAN et al., 2003).

O espermatozoide tem papel fundamental no início do processo de fertilização até as primeiras divisões celulares. Estudos demonstram a influencia paterna direta com relação ao índice de blastocisto produzido (COMIZZOLI et al., 2000; WARD et al., 2001). Por isso, qualquer alteração na capacidade de união com a zona pelúcida ou qualquer alteração no material genético espermático afetará o início e o desenvolvimento embrionário. Tamanha a importância desse processo que estudos correlacionaram a fertilidade de um touro com a capacidade de fusão entre espermatozoide e oócito (FAZELI et al., 1993).

Mesmo sabendo-se que a PIV gera maior formação de espécies reativas de oxigênio do que a produção *in vivo*, devido ao fato das células serem cultivadas *in vitro* sob altas concentrações de oxigênio e gás carbônico, ainda existem discrepâncias à respeito da quantidade mínima de ROS necessária para que ocorra a maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* (DALVIT et al., 2005).

Foi comprovado que o ânion superóxido é necessário para o estágio final de desenvolvimento embrionário, além de aparecer como protagonista no processo de hiperativação e capacitação espermática (LAMIRANDE; GAGNON, 1995). No entanto correlação negativa entre quantidade de ROS e taxa de fertilização *in vitro* foi encontrada, indicando que apesar de necessárias, as ROS devem ser controladas nesse processo (KODAMA; KURIBAYASHI; GAGNON, 1996).

Por isso, se torna essencial o desenvolvimento de um meio diluente e crioprotetor que melhor preserve as características das células espermáticas e combata a formação das espécies reativas de oxigênio (LUVONI; KESKINTEPE; BRACKETT, 1996).

Foi realizado o teste de PIV, em ovinos, utilizando amostras seminais criopreservadas em meios que continham gema de ovo e lecitina de soja, a maior taxa de clivagem foi observada no grupo lecitina de soja, além de não ter havido diferenças na taxa de blastocisto. Adicionalmente, foi concluído que a lecitina de soja seria capaz de substituir a gema de ovo nos diluidores de amostras seminais destinadas a PIV (FOROUZANFAR et al., 2010).

Diversos estudos demonstraram o efeito da adição de antioxidantes, principalmente α -tocoferol e ácido ascórbico, ao meio de maturação oocitária, seus resultados foram controversos de acordo com a concentração e associação utilizadas (DALVIT et al., 2005; SILVA et al., 2007). Segundo Gonçalves et al. (2010) a suplementação com antioxidantes manteve a qualidade espermática e garantiu o desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto durante a PIV.

Porém, apesar das preocupações em substituir os diluidores à base de produtos de origem animal e aprimorar a técnica de PIV, são necessários mais estudos acerca do efeito dos diluidores seminais sobre a taxa de fertilidade *in vitro*, associando diluidores sem produtos de origem animal à diversos tipos de antioxidantes.

Hipótese

"Transportai um punhado de terra todos os dias e fareis uma montanha."

Confúcio

3 HIPÓTESE

Partindo da premissa de que durante o processo de criopreservação os espermatozoides mantidos em diluidor à base de lecitina de soja sofrem maior ataque das espécies reativas de oxigênio, apresentando menor qualidade do que células espermáticas criopreservadas em diluidores à base de gema de ovo, a hipótese do presente experimento é:

- ✓ A adição de antioxidante ao diluidor à base de lecitina de soja melhora a morfofuncionalidade espermática e fertilidade do sêmen bovino criopreservado.

Objetivos

"O homem mede a sua força somente quando se defronta com o obstáculo."

Antoine de Saint-Exupéry

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Comparar o efeito do diluidor à base de gema de ovo com o efeito do diluidor à base de lecitina de soja (com e sem antioxidantes), sobre a manutenção da qualidade de amostras seminais bovinas criopreservadas.

4.2 Específicos

1. Avaliar a motilidade e cinética celular, integridade de membranas plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial, suscetibilidade celular à fragmentação de DNA e ao estresse oxidativo de espermatozoides bovinos criopreservados com diluidores à base de gema de ovo e lecitina de soja - com e sem antioxidantes (Experimento 1).
2. Comparar o potencial de fertilidade *in vivo*, por inseminação artificial em tempo fixo, de amostras seminais bovinas criopreservadas com diluidor à base de gema de ovo, e diluidores à base de lecitina de lecitina de soja - com e sem antioxidantes (Experimento 2).
3. Comparar o potencial de fertilidade *in vitro*, de amostras seminais bovinas criopreservadas com diluidor à base de gema de ovo, e diluidores à base de lecitina de lecitina de soja - com e sem antioxidantes (Experimento 3).

Materiais e Métodos

"Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado."

Roberto Shinyashiki

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi dividido em 3 experimentos, o plano de trabalho geral está representado na figura 4.

Figura 4 – Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.1 Experimento 1 – Avaliação e criopreservação de amostras espermáticas bovinas

Este experimento foi dividido em 3 etapas.

5.1.1 Locais

- ✓ Estancia Cuapé – Compensa S.A - Situada no Departamento de San Pedro - distrito General Resquín¹ – Paraguai (Etapas 1 e 2).
- ✓ Laboratório de Andrologia (LA) - Departamento de Reprodução Animal (VRA) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) - Situado no campus da Cidade Universitária – Butantã – São Paulo - Brasil (Etapa 3).
- ✓ Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal - Departamento de Reprodução Animal (VRA) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) - Situado no campus da Cidade Universitária – Butantã – São Paulo - Brasil (Etapa 3).

5.1.2 Etapa 1- Colheita e avaliação de amostras espermáticas e seleção dos reprodutores

¹ Latitude: 24° 3' 58.00"S, Longitude: 56° 26' 53.49"W

Previamente ao início do experimento, todos os bovinos machos da propriedade (total de 30 animais) passaram por exame andrológico e duas colheitas de sêmen com intervalo de 15 dias, para nivelamento biológico. Esses animais foram contidos em tronco apropriado e avaliados quanto ao escore de condição corporal, perímetro testicular, consistência testicular, condição de aprumos e condições das glândulas sexuais acessórias.

Após a avaliação inicial, foi realizada a limpeza externa do prepúcio com água e sabão e corte dos pelos prepúciais, limpeza interna do prepúcio com solução salina estéril pré-aquecida a 37°C e secagem da região com papel absorvente. O sêmen foi colhido pelo método de eletro-ejaculação², em tubos estéreis graduados, pré-aquecidos a 37°C e isolados do choque térmico e luminosidade.

As amostras seminais foram então avaliadas quanto ao turbilhonamento, motilidade subjetiva, vigor, concentração e morfologia espermática (dados utilizados apenas para seleção animal). O volume seminal foi averiguado pela leitura direta do tubo de colheita graduado em mililitros (mL).

a. Perímetro e consistência testiculares

Para a mensuração do perímetro testicular foi utilizada fita específica, dotada de escala em centímetros (cm), subdividida em milímetros (mm), disposta na região central do eixo vertical do testículo, sem realizar demasiada pressão. A consistência testicular foi realizada por palpação, sempre pelo mesmo médico veterinário, avaliando a tensão fibro-elástica do tecido testicular e classificando em escala de 1 (mais flácida) a 5 (mais firme).

b. Glândulas sexuais acessórias

Pela palpação retal, as glândulas sexuais acessórias foram avaliadas quanto à forma, tamanho, consistência, localização e sensibilidade.

² Eletro-ejaculador - Autojac® 3.0 - Neovet - Uberaba - Brasil.

c. Turbilhonamento

Classificado em escala de 1 a 5, segundo ao movimento espermático visualizado macroscopicamente, sendo 1 com movimentos lentos e 5 com movimentos intensos.

d. Motilidade e vigor espermáticos

Para tais, uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas, 37°C) e observada em microscopia de luz transmitida³, com aumento de 100 vezes. A motilidade foi dada pela estimativa subjetiva do percentual de células móveis, sendo então, classificada em escala de 0 a 100%, onde 0% para nenhum espermatozoide móvel no campo e 100% para todos os espermatozoides móveis. Concomitante à motilidade, o vigor foi avaliado quanto à intensidade e uniformidade dos movimentos espermáticos, classificados em uma escala de 1 a 5, na qual, 1 representa movimentos fracos e 5 representa movimentos vigorosos, progressivos e uniformes.

e. Concentração espermática

Uma alíquota de 10µL de sêmen foi diluído em 990µL de formol salino tamponado, obtendo diluição de 1:100, as células espermáticas foram contadas em câmara de *Neubauer*, em microscopia de luz transmitida com aumento de 400x. Após a contagem, os valores da quantidade de espermatozoides por mililitro de sêmen foi calculado pela fórmula:

$$\text{Concentração} = n \times 5 \times 10 \times d \times 1000$$

Onde: n = Quantidade média de espermatozoides contados na câmara de Neubauer
e d = Diluição

f. Características morfológicas

Para avaliar as alterações morfológicas, o sêmen foi diluído em formol salino tamponado, aproximadamente 100µL de sêmen em 1mL de formol salino, e a leitura

³ Microscópio - Axiostar Plus® - Carl Zeiss - Alemanha.

realizada em preparações úmidas, sob microscopia de contraste de fase⁴ com aumento de 1000x, contando-se 200 células por amostra e anotando todas as alterações observadas, em seguida dividindo-as em defeitos maiores e defeitos menores, segundo classificação sugerida por Blom (1973).

g. Seleção dos animais

Foram utilizados, para este experimento, 20 touros da raça Brangus (*Bos taurus indicus* X *Bos taurus taurus*), em idades entre 3 e 4 anos, com histórico reprodutivo conhecido, criados a campo e não selecionados para a congelabilidade seminal.

Todos os animais obtiveram seus resultados nos exames andrológicos segundo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998):

- ✓ Motilidade $\geq 70\%$
- ✓ Vigor ≥ 3
- ✓ Turbilhonamento ≥ 3
- ✓ Concentração aproximada de $1,4 \times 10^9$ spz/mL
- ✓ Defeitos Totais $\leq 30\%$
- ✓ Perímetro Escrotal ≥ 40 cm

5.1.3 Etapa 2 - Diluição e criopreservação de amostras espermáticas bovinas

Todo o material utilizado para a manipulação seminal foi mantido aquecido, na temperatura de 37°C, a fim de evitar choque térmico e alterações das características seminais.

⁴ Microscópio - Axiostar Plus® - Carl Zeiss - Alemanha.

a. Preparo dos diluidores

Foram utilizados dois diluidores comerciais, um à base de gema de ovo e outro à base de lecitina de soja. Os diluidores foram preparados seguindo as recomendações do fabricante, sendo que no AndroMed⁵ foi adicionado quatro partes de água destilada (35°C) em uma parte do produto concentrado. Para o Triladyl⁶, a preparação foi feita pela mistura de uma parte do produto concentrado, três partes de água destilada e uma parte de gema de ovo, de modo que o diluente contivesse 20% de gema de ovo em sua composição.

Para o diluidor à base de gema de ovo, foram utilizados ovos de galinha, cujas cascas foram lavadas com água e sabão, secas com papel absorvente e limpas com álcool. A gema foi separada da clara e sobre filtro de papel, ela foi deslizada para a remoção total do conteúdo de albumina. Logo após, foi feito um orifício na gema com o auxílio de agulha estéril, seu conteúdo foi recolhido em uma proveta e sua membrana foi descartada. Após toda a mistura, o diluidor à base de gema de ovo foi filtrado em gaze estéril.

Após o preparo, os diluidores foram envasados em tubos estéreis e mantidos congelados (-10°C).

Como antioxidante enzimático foi utilizado superóxido dismutase⁷ (SOD), extraída de fígado bovino na concentração de 60UI/mL e como antioxidante não enzimático, foi utilizado o ácido ascórbico⁸ na concentração de 4,5mM. Os antioxidantes, ambos em apresentação em pó, foram pesados em balança de alta precisão e diluídos diretamente nos diluidores previamente preparados. Os tipos de antioxidante escolhidos para esse experimento e suas concentrações foram baseados em resultados positivos encontrados em estudo prévio com congelamento de sêmen de epidídimo bovino (NICHI, 2009).

Dessa maneira, os grupos experimentais formados estão descritos na figura 5.

⁵ Diluidor – AndroMed® - Lecitina de soja - MiniTub – França. REF.: 13503/0200

⁶ Diluidor – Triladyl® - Gema de ovo - MiniTub – França. REF.: 13500/0250

⁷ Superoxide Dismutase from bovine liver – Sigma Aldrich® - USA. REF.: S8160

⁸ (+)-Sodium L-ascorbate – powder- Sigma Aldrich® - USA. REF.: A4034

Figura 5 – Representação gráfica dos grupos experimentais: diluidores.

Fonte: Elaborado pelo autor.

b. Diluição e congelação de amostras espermáticas

Logo após a adição dos antioxidantes ao diluidor à base de lecitina de soja, cada ejaculado, que estava sendo mantido em banho-maria (37°C) foi diluído em cada grupo experimental na concentração de 30 milhões de espermatozoides móveis por palheta. As amostras seminais já diluídas foram então envasadas em palhetas francesas⁹ de 0,5mL, devidamente identificadas, pré-aquecidas a 37°C e lacradas com álcool polivinílico.

Para a criopreservação do sêmen, foi utilizado equipamento portátil de criopreservação espermática automática¹⁰, composto de aparelho programável, equipado com um porta-palhetas, um tubo de refrigeração e uma caixa térmica para nitrogênio líquido. Para a refrigeração as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, acondicionado no tubo de refrigeração, seguindo uma curva de -0,25°C/minuto, até alcançar a temperatura

⁹ Palhetas Francesas 0,5mL – IMV International - USA. REF.: 005569

¹⁰ Máquina de congelação – TK 3000® - TK Tecnologia em Congelação LTDA – Uberaba – Brasil.

de 5°C. Em seguida, o porta-palhetas foi colocado na caixa térmica contendo nitrogênio líquido e a curva de congelação seguinte foi de -20°C/minuto, até atingir a temperatura de -120°C. Por fim, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido, na temperatura de -196°C. As palhetas foram armazenadas nos canecos do botijão criogênico, devidamente identificados.

5.1.4 Etapa 3 – Descongelação e avaliação de amostras espermáticas bovinas

As palhetas, estocadas em botijão de nitrogênio líquido, foram descongeladas em banho-maria, a uma temperatura de 37°C durante 30 segundos, foram secas com papel absorvente e cortadas com tesoura, o sêmen foi recolhido em microtubos, que foram mantidos em banho-maria a 37°C durante todo o processo de análise seminal. Em seguida, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade computadorizada, características morfológicas, integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal, potencial da atividade citoquímica mitocondrial, suscetibilidade da cromatina à desnaturação e índice de resistência ao estresse oxidativo.

Após avaliação da motilidade e vigor espermáticos, as amostras seminais foram submetidas a duas “lavagens” para remoção de todo diluidor/crioprotetor, para que fosse possível prosseguir com as demais avaliações. Foi adicionado ao sêmen, tampão-fosfato-salino (PBS) pré-aquecido (37°C), a mistura foi centrifugada em 800g durante 10 minutos, após esse processo, o sobrenadante foi descartado e os “pellets” de espermatozoides foram ressuspensos em PBS (37°C).

a. Avaliação computadorizada da motilidade

As células espermáticas criopreservadas receberam avaliação computadorizada da motilidade (CASA¹¹-*Computer Assisted Semen Analysis*), para isso, 5µL da amostra descongelada foi colocada em câmara de leitura própria (2X-CEL® *Dual Sided Sperm Analysis Chamber*, 20 micron) e inserida no aparelho que captura a imagem da amostra por um microscópio acoplado a um computador. Os dados são enviados à um sistema computacional responsável por realizar a análise do movimento espermático por um programa chamado *Animal Motility*, sendo previamente ajustado (*setup*) para a análise de sêmen bovino.

Para a leitura e análise, foram selecionados manual e aleatoriamente 6 campos por amostra. Diversos parâmetros relacionados à cinética espermática são calculados na avaliação computadorizada do sêmen, os parâmetros escolhidos para este experimento foram: **1.** Motilidade total (MOT, %); **2.** Motilidade progressiva (PROG, %); **3.** Velocidade de trajeto (VAP, µm/s); **4.** Velocidade progressiva (VSL, µm/s); **5.** Velocidade curvilinear (VCL, µm/s); **6.** Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm); **7.** Frequência de batimentos espermáticos (BCF, Hz); **8.** Retilinearidade (STR, %); **9.** Linearidade (LIN, %); **10.** Velocidade da célula (RAPID), cujas definições foram descritas por Arruda (2000).

b. Avaliação da integridade da membrana plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizada a coloração de eosina-nigrosina (E/N) segundo Barth e Oko (1989). Nesta coloração, por alterações na permeabilidade da membrana espermática a eosina atravessa a membrana plasmática lesionada, dessa maneira células com membrana plasmática não-integra adquirem uma coloração rósea, enquanto que células com membrana plasmática íntegra, não são coradas. Para a avaliação, uma alíquota de sêmen (5µL) foi misturada ao corante na proporção de 1:1 e realizados esfregaços sobre lâminas de microscopia. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz transmitida sob aumento de 1000x, em imersão. Foram contadas 200 células por amostra, classificadas como:

¹¹ Computer Assisted Sperm Analysis – CASA – Hamilton Thorne – IVOS – USA.

- ✓ Células com membrana plasmática não-integra: coradas.
- ✓ Células com membrana plasmática íntegra: não coradas.

c. Avaliação da integridade da membrana acrossomal

Visando monitorar os possíveis danos causados na membrana acrossomal durante o congelamento das amostras, foi utilizado o corante *fast Green/rosa bengala*, segundo a técnica de coloração simples de Pope (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991). Uma alíquota de cada amostra (5µL) foi misturada ao corante (5µL), sendo incubada por 70 segundos a 37°C. Após a incubação, foram feitos esfregaços sobre lâminas de microscopia, que foram analisadas em microscópio de luz transmitida em aumento de 1000x, em imersão. Foram contadas 200 células por amostra, classificadas como:

- ✓ Membrana acrossomal íntegra: região acrossomal de coloração lilás, levemente mais escura que a região pós-acrossomal
- ✓ Membrana acrossomal não-integra: região acrossomal de coloração rósea, levemente mais clara que a região pós-acrossomal

d. Avaliação do potencial da atividade citoquímica mitocondrial

Para realização desta técnica, uma alíquota de 30µL de amostra foi incubada com 30µL do corante DAB (1mg/mL de PBS), a 37°C, durante 1 hora. Após incubação, foram feitos esfregaços em lâmina de vidro e estas foram submersas em formol a 10% por 10 minutos, para que o material fosse fixado. As lâminas foram então secas em temperatura ambiente sob proteção de luminosidade. O potencial da atividade citoquímica da mitocôndria espermática foi avaliado segundo descrito por Hrudka (1987). Desta maneira, as lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase, em aumento de 1000x, em imersão. Foram contados 200 espermatozoides por lâmina e classificados de acordo com a coloração da peça intermediária em:

- ✓ Alto potencial: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada.

- ✓ Baixo potencial: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada.

e. Avaliação da suscetibilidade da cromatina à desnaturação

Para o ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA), foi utilizada metodologia proposta por Evenson et al. (1999). O conteúdo de uma palheta de sêmen, de cada animal e tratamento foi avaliado por citometria de fluxo. Resumidamente, uma alíquota de 500µl de sêmen foi colocada em microtubo identificado e esse armazenado em freezer convencional, em uma temperatura de -17°C, para posterior análise em laboratório apropriado. A amostra foi descongelada em banho-maria (37°C/30 segundos) e diluída em tampão TNE na concentração de 2×10^6 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 do corante laranja de acridina (LA) ao DNA espermático. Após este período o sêmen foi incubado com 0,6mL de solução de LA (6µg/mL). As amostras foram analisadas utilizando um citômetro de fluxo¹² com excitação de 488nm e 15 mW. A avaliação da LA foi feita baseada na diferença entre a fluorescência emitida pelos espermatozoides com DNA íntegro (dupla fita), que emitem fluorescência verde e os com DNA fragmentado (fita simples), que emitem fluorescência vermelha.

f. Avaliação do índice de resistência ao estresse oxidativo

Também classificado como avaliação da suscetibilidade espermática ao estresse oxidativo induzido, baseia-se na metodologia descrita por Ohkawa, Ohish e Yagi (1979), que tem como fundamento a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de malondialdeído (MDA), subproduto da peroxidação de lipídeos, apresenta diversos tons de coloração rósea de acordo com a quantidade de peroxidação lipídica sofrida pela amostra. Foi utilizado um “sistema gerador de ROS” com posterior mensuração da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) pela espectrofotometria.

¹² Citômetro de Fluxo - Guava EasyCyte® - Merck Millipore – Alemanha.

Em uma alíquota de 300µL da amostra foi adicionado o “sistema gerador de ROS” formado pelo ácido ascórbico (75µL) e o sulfato de ferro (75µL). Mantido em incubação durante 90 minutos a 37°C. Após o período de incubação, foram adicionados 900µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugados a 19.700g, durante 10 minutos, em temperatura de 4°C, para precipitação de proteínas. Alíquotas de 600µL do sobrenadante foram colocadas em criotubos identificados e receberam 600µL de ácido tiobarbitúrico (TBA), dissolvido em hidróxido de sódio (NaOH), preparado instantes antes de ser utilizado. Esta mistura foi incubada em banho-maria (100°C) por 15 minutos e resfriados imediatamente em banho de gelo, no intuito de parar a reação. A concentração de TBARS foi quantificada através de leitura em espectrofotômetro¹³, num comprimento de onda de 532nm e os resultados foram comparados com uma curva padrão, feita previamente com malondialdeído.

O MDA é uma das principais substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e a concentração de TBARS é determinada utilizando-se o valor $1,56 \times 10^5 \times M^{-1} mL^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do malondialdeído (BUEGE; AUST, 1978). A concentração de TBARS nas amostras foi expressa em nanogramas de TBARS por milhões de espermatozoides (ng/10⁶ spz).

5.2 Experimento 2 – Avaliação da fertilidade *in vivo* de amostras espermáticas bovinas

5.2.1 Local

- ✓ Estancia Lola Miño – Situada no Departamento Central – distrito de Villeta¹⁴ – Paraguai.

¹³ Espectrofotômetro - Ultrospec 3300pro, Amersham Pharmacia

¹⁴ Latitude: 14° 59' 0" S, Longitude: 61° 25' 0" W

5.2.2 Inseminação artificial em tempo fixo

Previamente a esta etapa do estudo, foi realizado exame ginecológico das fêmeas bovinas da propriedade, pela técnica de ultrassonografia¹⁵ transretal, sendo descartadas as fêmeas que possuíam alterações de conformação, tonicidade ou qualquer outro problema nos órgãos reprodutivos. Todas as fêmeas receberam sal mineral (Fosbovi20^{®16}) à campo e 30 dias antes da IATF receberam vacina reprodutiva (Bioabortogen H^{®17}), tratamentos e produtos adotados rotineiramente na fazenda.

Foram utilizadas 450 fêmeas bovinas, mestiças, criadas à campo em piquetes sem contato com machos, utilizadas rotineiramente no programa de reprodução (IATF) da propriedade.

Todos os animais receberam tratamento hormonal adequado para a sincronização de estro. O protocolo hormonal utilizado consistiu na inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona¹⁸, administração intramuscular de 2mg de benzoato de estradiol¹⁹ no dia zero (D0) do protocolo. Oito dias depois (D8), o dispositivo intravaginal foi removido e administrou-se 0,53mg de cloprostenol sódico²⁰, 1mg de cipionato de estradiol²¹ e 400UI de gonadotrofina coriônica equina²². Após dois dias (D10), procedeu-se a inseminação artificial em tempo fixo (Figura 6). Para a IATF, foram utilizadas apenas amostras seminais de 2 touros, as quais apresentaram pós-descongelamento 15 milhões de espermatozoides móveis por palheta. Todas as inseminações artificiais do experimento foram realizadas pelo mesmo médico veterinário.

¹⁵ *Ultrassom – Aloka SSD500 – Japão.*

¹⁶ *Fosbovi[®] – Suplemento mineral oral, para bovinos – Tortuga – Paraguai.*

¹⁷ *BioabortogenH[®] – vacina reprodutiva contra IBR, BVD, Campylobacteriose e Leptospirose -Biogénesis– Argentina.*

¹⁸ *Dispositivo intravaginal de Progesterona – Sincrogest[®]1g – Ourofino- Brasil.*

¹⁹ *Benzoato de Estradiol - BE – Sincrodiol[®] - Ourofino- Brasil.*

²⁰ *Cloprostenol sódico - PGF2a – Sincrocio[®] - Ourofino- Brasil.*

²¹ *Cipionato de Estradiol - ECP – SincroCP[®] - Ourofino- Brasil.*

²² *Gonadotrofina Coriônica Equina - ECG – Novormon[®] 5000 – Syntex S.A- Argentina.*

Figura 6 – Representação esquemática do protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.3 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IATF, pelo método de ultrassonografia transretal, com aparelho equipado com transdutor linear de 5MHz, para confirmação de prenhez. Sendo classificado em prenhez positiva ou negativa. A detecção de uma vesícula embrionária contendo um embrião viável (com batimentos cardíacos) foi utilizada como indicador positivo de prenhez. A taxa de prenhez (%) foi calculada pelo número de fêmeas com prenhez positiva, dividido pelo número total de fêmeas inseminadas, multiplicado por cem.

5.3 Experimento 3 – Avaliação da fertilidade *in vitro* de amostras espermáticas bovinas

5.3.1 Local

- ✓ Vitrogen – Laboratório de biotecnologias da reprodução animal – Situado na cidade de Cravinhos – São Paulo – Brasil.

5.3.2 Produção *in vitro* de embriões

Para a PIV, foram utilizadas as mesmas amostras seminais utilizadas para a IATF (mesma partida e mesmos touros) e amostra espermática de um touro controle, rotineiramente utilizados nas pesquisas do laboratório supracitado. Sendo assim, os grupos estudados foram LE, LA, LS, GO e CP (Controle Positivo) (Figura 7). O processo de PIV foi realizado pelo mesmo laboratorista durante todo o experimento.

Figura 7 – Representação esquemática das amostras seminais e grupos experimentais para o teste de fertilização *in vitro*

Fonte: Cedido por Daniel Carlino - Vitrogen .

Os ovários bovinos foram coletados em abatedouro, situado na região da cidade de Sertãozinho - SP e transportados ao laboratório em solução salina a 35°C. No laboratório, esses ovários foram lavados com solução salina e mantidos em banho-maria a 35°C. Os folículos antrais (3 a 8mm de diâmetro) foram aspirados com o uso de agulha (21G) e seringa

(10mL). O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de 50mL e mantido em banho-maria a 35°C por 10 minutos para que ocorresse a sedimentação dos oócitos.

Posteriormente, o sedimento foi transferido para placa de petri de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópio²³. Foram selecionados oócitos com citoplasma de coloração homogênea e com mais de duas camadas completas de células do *cumulus*. Considerado como dia -1 do experimento.

Ainda no dia -1, para a maturação *in vitro* (MIV), os oócitos selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2mM de Piruvato, 20mM de HEPES, 5mM de Bicarbonato de sódio, 75µg de Sulfato de amicacina/mL) e uma vez em meio de maturação B-199 (constituído por meio TCM-199 suplementado com 0,2mM de Piruvato, 25mM de Bicarbonato de Sódio, 75µg de Sulfato de amicacina/mL, 1µg de 17-β Estradiol/mL, 500UI de FSH/mL, 100UI de hCG/mL) e 10% de SFB. Foram transferidas 15 estruturas por microgota de 100µL, que foram cobertas com óleo mineral. Os oócitos foram maturados durante 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Para a seguinte etapa, a fecundação *in vitro* (FIV), em placa de petri foram aliquotadas microgotas de 100µl de meio TALP suplementado com heparina (10µg/mL), piruvato (22µg/mL), gentamicina (50µg/mL), albumina sérica bovina (BSA) sem ácidos graxos (6mg/mL) e solução de PHE (2µM de penicilina, 1µM de hipotaurina e 0,25µM de epinefrina).

As palhetas contendo o sêmen foram descongeladas em banho-maria, a 35°C durante 30 segundos, seu conteúdo foi centrifugado em gradiente de Percoll (45 e 90) para obtenção dos espermatozoides móveis, e remoção do diluidor e plasma seminal. A concentração espermática final utilizada para a FIV foi de 1 milhão de células/mL. Após esse período, os espermatozoides foram transferidos para as microgotas juntamente com os oócitos maturados (aproximadamente 15 oócitos por microgota) e incubados em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, a 38,5°C durante 22 horas. Considerado como dia 0 do experimento.

²³ Microscópio estereoscópio – Coleman® – Brasil.

Para cada dia de fecundação *in vitro* foram preparadas 2 placas de petri, com 7 e 8 microgotas em cada, totalizando 15 microgotas, sendo 3 microgotas para cada grupo estudado (Figura 8).

Figura 8 – Representação esquemática da disposição de cada grupo estudado nas microgotas para fertilização *in vitro*

Fonte: Cedido por Daniel Carlino - Vitrogen .

Os zigotos foram separados em grupos e co-cultivados com células da granulosa em meio CR2 suplementado com 5% de SFB e 30mg BSA/mL (WATANABE et al., 1999), dia 1. No dia 3 do experimento, foi realizada a classificação embrionária e a renovação de 50% do meio de cultura (*feeding*). No dia 6, foi realizado o segundo *feeding* e a segunda classificação embrionária. Nos dias 7 e 9 do experimento, também foi realizada a classificação embrionária.

5.3.3 Classificação embrionária

No decorrer do experimento os embriões foram classificados em: embriões clivados (D3); blastocisto em desenvolvimento (D7) e blastocistos totais (D9) (Figura 9).

O cálculo das taxas (%) de embriões clivados, blastocistos D7 e blastocistos totais foi feito pela razão entre a quantidade de cada grupo e a quantidade de oócitos viáveis, multiplicados por 100.

5.3.4 Avaliação da motilidade espermática

A motilidade das amostras espermáticas foi avaliada sob microscopia de luz transmitida, em três momentos distintos: logo após a descongelação da amostra espermática (Motilidade inicial), logo após a centrifugação em gradiente de Percoll (Motilidade intermédia) e 20 horas após o início do processo de fecundação *in vitro* (Motilidade final), realizada na própria microgota de FIV.

Figura 9 – Representação do desenvolvimento do processo de fertilização *in vitro*.

Fonte: Cedido por Daniel Carlino - Vitrogen .

5.4 Análises Estatísticas

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados com auxílio do software *Statistical Analysis System for Windows SAS®* (SAS, 2001). As variáveis contínuas foram avaliadas quanto a normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE e submetidas ao teste de Bartlett para analisar a homogeneidade das variâncias. Os dados que não atenderam as premissas da análise de variância foram analisados por log normal. Após essa avaliação, o procedimento GLIMMIX foi utilizado para análise de variância e para determinar diferença de médias entre os tratamentos. Além disso, os dados de distribuição binomial foram analisados por regressão logística utilizando o PROC GLIMMIX.

Considerou-se diferença significativa entre as variáveis testadas quando o $P < 0,05$. As variáveis dependentes paramétricas foram expressas em média e erro padrão da média (média $\pm$ erro padrão) e a binomiais em porcentagem (%).

Resultados

"Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas."

Antoine de Saint-Exupéry

6 RESULTADOS

6.1 Resultados – Experimento 1 – Avaliação e criopreservação de amostras espermáticas bovinas

Entre todas as morfologias espermáticas avaliadas neste estudo, apenas dois defeitos espermáticos apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados. A porcentagem de células com danos na peça intermediária foi menor no grupo LS do que nos outros grupos de diluidores à base de lecitina de soja LE e LA ($P=0,04$), sendo assim, foi visto que a lecitina de soja associada à superóxido dismutase ($0,90 \pm 0,19$) foi o diluidor que forneceu ao espermatozoide uma proteção semelhante à obtida pelo uso de gema de ovo ($1,20 \pm 0,25$). Ao contrário do que foi verificado em relação aos defeitos de peça intermediária, os espermatozoides criopreservados com diluidor lecitina de soja + ácido ascórbico foram as que menos sofreram danos de dobramento de flagelo, frente ao diluidor gema de ovo ($P=0,01$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Médias $\pm$ erros padrão da média da morfologia de espermatozoide bovino criopreservado nos diferentes diluidores – Paraguai - 2011

Diluidores	Morfologia espermática (%)	
	<i>Peça intermediária</i> ¹	<i>Cauda fortemente dobrada/enrolada</i> ²
Lecitina de Soja	$1,75 \pm 0,46^a$	$4,55 \pm 1,02^{a,b}$
Lecitina de Soja + Ácido Ascórbico	$2,05 \pm 0,47^a$	$4,35 \pm 1,06^b$
Lecitina de Soja + SOD	$0,90 \pm 0,19^b$	$5,05 \pm 1,09^{a,b}$
Gema de Ovo	$1,20 \pm 0,25^{a,b}$	$6,55 \pm 0,88^a$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P<0,05$).

¹ $P=0,04$; ² $P=0,01$

SOD – Superóxido dismutase

Apesar de haver diferenças entre alguns grupos em relação a dois tipos de alterações da morfologia espermática, as porcentagens de suas ocorrências não foram suficientes para causar diferenças nas variáveis defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais, como pode ser verificado na tabela 2.

Tabela 2 - Médias $\pm$ erros padrão da média dos defeitos de espermatozoide bovino criopreservado nos diferentes diluidores – Paraguai - 2011

Diluidores	Defeitos espermáticos (%)		
	<i>Maiores</i> ¹	<i>Menores</i> ²	<i>Totais</i> ³
Lecitina de Soja	9,95 $\pm$ 1,40	5,60 $\pm$ 0,65	15,55 $\pm$ 1,62
Lecitina de Soja + Ácido Ascórbico	10,90 $\pm$ 1,55	7,35 $\pm$ 0,76	18,25 $\pm$ 1,76
Lecitina de Soja + SOD	8,95 $\pm$ 1,18	6,85 $\pm$ 0,77	15,80 $\pm$ 1,58
Gema de Ovo	11,10 $\pm$ 1,15	4,75 $\pm$ 0,85	15,85 $\pm$ 1,56

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

¹ $P=0,33$; ² $P=0,11$; ³ $P=0,54$

SOD – Superóxido dismutase

Na avaliação da integridade celular, não houve diferença nos dados obtidos tanto na avaliação da integridade de membrana plasmática, quanto na avaliação da integridade de membrana acrossomal em nenhum dos grupos estudados (Tabela 3).

Tabela 3 – Médias $\pm$ erros padrão da média da integridade de membranas de espermatozoide bovino criopreservado nos diferentes diluidores – Paraguai - 2011

Diluidores	Integridade de membranas espermáticas (%)	
	<i>Plasmática</i> ¹	<i>Acrossomal</i> ²
Lecitina de Soja	23,60 $\pm$ 2,45	90,05 $\pm$ 1,55
Lecitina de Soja + Ácido Ascórbico	24,80 $\pm$ 3,18	90,65 $\pm$ 1,58
Lecitina de Soja + SOD	26,00 $\pm$ 2,43	91,35 $\pm$ 1,27
Gema de Ovo	30,80 $\pm$ 2,58	86,70 $\pm$ 1,77

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

¹ $P=0,25$; ² $P=0,16$

SOD – Superóxido dismutase

Os dados obtidos a partir da avaliação do potencial da atividade mitocondrial, dividido em dois graus de atividade, estão descritos na tabela 4. A ocorrência de células com alto potencial mitocondrial foi semelhante em três grupos estudados, sendo menor apenas no grupo que recebeu ácido ascórbico (GO 76,90 $\pm$ 2,90; LE 69,50 $\pm$ 3,73; LS 66,05 $\pm$ 4,95; LA 59,00 $\pm$ 4,70). Consequentemente, a porcentagem de células com baixo potencial mitocondrial foi estatisticamente maior apenas no grupo LA.

Tabela 4 - Médias $\pm$ erros padrão da média do potencial mitocondrial de espermatozoide bovino criopreservado nos diferentes diluidores – Paraguai - 2011

Diluidores	Potencial mitocondrial espermático (%)	
	<i>Alto</i> ¹	<i>Baixo</i> ²
Lecitina de Soja	69,50 $\pm$ 3,73 ^{a, b}	30,50 $\pm$ 3,72 ^{a, b}
Lecitina de Soja + Ácido Ascórbico	59,00 $\pm$ 4,70 ^b	39,50 $\pm$ 4,36 ^a
Lecitina de Soja + SOD	66,05 $\pm$ 4,95 ^{a, b}	33,95 $\pm$ 4,95 ^{a, b}
Gema de Ovo	76,90 $\pm$ 2,90 ^a	23,10 $\pm$ 2,89 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

¹ $P=0,03$; ² $P=0,007$

SOD – Superóxido dismutase

As avaliações de suscetibilidade espermática ao estresse oxidativo e à desnaturação de cromatina estão apresentados na tabela 5. Foi possível verificar maior resistência espermática ao estresse oxidativo induzido apenas nas amostras criopreservadas com gema de ovo ($255,23 \pm 36,19$, $P=0,0004$), sendo que a adição de antioxidante ao diluidor preparado com lecitina de soja não gerou proteção adicional contra o estresse oxidativo.

Ao contrário do que foi observado em relação aos níveis de TBARS nas amostras seminais, as células criopreservadas no diluidor à base de gema de ovo foram mais susceptíveis a desnaturação do DNA que as amostras criopreservadas nos diluidores à base de lecitina de soja (GO $2,61 \pm 0,41$; LE $0,61 \pm 0,09$; LA $0,51 \pm 0,07$; LS $0,69 \pm 0,10$).

Tabela 5 - Médias $\pm$ erros padrão da média da suscetibilidade ao estresse oxidativo induzido e desnaturação da cromatina de espermatozoide bovino criopreservado nos diferentes diluidores – Paraguai - 2011

Diluidores	Suscetibilidade espermática	
	TBARS (ng/10 ⁶ sptz) ¹	SCSA (%) ²
Lecitina de Soja	595,40 $\pm$ 103,73 ^a	0,61 $\pm$ 0,09 ^b
Lecitina de Soja + Ácido Ascórbico	640,36 $\pm$ 88,35 ^a	0,51 $\pm$ 0,07 ^b
Lecitina de Soja + SOD	564,13 $\pm$ 57,91 ^a	0,69 $\pm$ 0,10 ^b
Gema de Ovo	255,23 $\pm$ 36,19 ^b	2,61 $\pm$ 0,41 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

¹ $P=0,0004$; ² $P=0,0001$

SOD – Superóxido dismutase; TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; SCSA – Ensaio da estrutura da cromatina espermática; sptz - espermatozoides

Os dados obtidos a partir da análise computadorizada da motilidade seminal (CASA) estão dispostos na tabela 6. Em relação aos outros grupos estudados, o grupo GO apresentou resultados significativamente menores para as variáveis: velocidade de trajeto (VAP, 69,23 $\pm$ 2,34) e velocidade curvilinear (VCL, 113,57 $\pm$ 4,87), também apresentou menores resultados em relação ao grupo LS para a variável velocidade progressiva (VSL); a amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) foi semelhante apenas entre os grupos GO e LE (6,19 $\pm$ 0,50).

Em contrapartida, as amostras diluídas com gema de ovo apresentaram maiores valores para as variáveis BCF (GO vs LE; 32,28 $\pm$ 0,57; 25,80 $\pm$ 1,91, respectivamente), STR (GO vs LA e LS, 85,90 $\pm$ 0,90; 77,50 $\pm$ 1,62; 71,65 $\pm$ 5,60, respectivamente) e LIN (GO vs LA e LS, 55,35 $\pm$ 1,18; 45,60 $\pm$ 1,64; 44,30 $\pm$ 3,85, respectivamente).

Todos os grupos apresentaram resultados semelhantes para as demais variáveis: motilidade total (MOT, $P=0,45$); motilidade progressiva (PROG, $P=0,71$) e células com movimentos rápidos (RAPID, $P=0,93$), apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Médias $\pm$ erros padrão da média da análise computadorizada da motilidade (CASA) de espermatozoide bovino criopreservado nos diferentes diluidores – Paraguai - 2011

Variáveis	Diluidores			
	Lecitina de Soja	Lecitina de Soja + Ácido Ascórbico	Lecitina de Soja + SOD	Gema de Ovo
<i>Motilidade total (%)</i> ¹	19,35 $\pm$ 2,86	22,80 $\pm$ 2,88	19,90 $\pm$ 3,12	27,85 $\pm$ 3,54
<i>Motilidade progressiva (%)</i> ²	10,85 $\pm$ 1,63	12,45 $\pm$ 1,40	12,35 $\pm$ 2,23	16,00 $\pm$ 2,34
<i>Velocidade de trajeto (μm/s)</i> ³	82,66 $\pm$ 5,89 ^a	91,05 $\pm$ 4,18 ^a	88,21 $\pm$ 9,99 ^a	69,23 $\pm$ 2,34 ^b
<i>Velocidade progressiva (μm/s)</i> ⁴	63,48 $\pm$ 4,05 ^{a, b}	67,18 $\pm$ 2,48 ^{a, b}	69,40 $\pm$ 9,03 ^a	58,44 $\pm$ 1,60 ^b
<i>Velocidade curvilínea (μm/s)</i> ⁵	142,74 $\pm$ 11,97 ^a	164,14 $\pm$ 9,06 ^a	149,45 $\pm$ 14,24 ^a	113,57 $\pm$ 4,87 ^b
<i>Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (μm)</i> ⁶	6,19 $\pm$ 0,50 ^{a, b}	6,86 $\pm$ 0,26 ^a	6,53 $\pm$ 0,58 ^a	5,35 $\pm$ 0,15 ^b
<i>Frequência de batimentos espermáticos (Hz)</i> ⁷	25,80 $\pm$ 1,91 ^b	27,32 $\pm$ 0,64 ^{a, b}	26,48 $\pm$ 2,22 ^{a, b}	32,28 $\pm$ 0,57 ^a
<i>Retilinearidade (%)</i> ⁸	77,00 $\pm$ 4,63 ^{a, b}	77,50 $\pm$ 1,62 ^b	71,65 $\pm$ 5,60 ^b	85,90 $\pm$ 0,90 ^a
<i>Linearidade (%)</i> ⁹	49,50 $\pm$ 3,93 ^{a, b}	45,60 $\pm$ 1,64 ^b	44,30 $\pm$ 3,85 ^b	55,35 $\pm$ 1,18 ^a
<i>Velocidade rápida (%)</i> ¹⁰	13,90 $\pm$ 2,01	17,80 $\pm$ 2,23	16,05 $\pm$ 2,66	18,30 $\pm$ 2,46

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

¹ $P = 0,45$; ² $P = 0,71$; ³ $P = 0,001$; ⁴ $P = 0,006$; ⁵ $P = 0,001$; ⁶ $P = 0,0006$; ⁷ $P = 0,004$; ⁸ $P = 0,004$; ⁹ $P = 0,006$; ¹⁰ $P = 0,93$

SOD – Superóxido dismutase

6.2 Resultados – Experimento 2 – Avaliação da fertilidade *in vivo* de amostras espermáticas bovinas

A tabela 7 apresenta a taxa de prenhez obtida em cada grupo de fêmeas inseminadas com os quatro grupos de amostras espermáticas do estudo. Foi verificado, que, apesar da diferença numérica entre os grupos, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P=0,65$).

Tabela 7 – Porcentagem de prenhez de vacas inseminadas em tempo fixo com amostra espermática bovina criopreservada nos diferentes diluidores – Paraguai - 2011

Diluidores	Prenhez	
	<i>n</i>	Taxa (%) ¹
Lecitina de Soja	108	58,33
Lecitina de Soja + Ácido Ascórbico	124	60,48
Lecitina de Soja + SOD	105	54,29
Gema de Ovo	109	62,39

¹ $P=0,65$.

SOD – Superóxido dismutase

6.3 Resultados – Experimento 3 – Avaliação da fertilidade *in vitro* de amostras espermáticas bovinas

No teste de fertilização *in vitro*, apenas o grupo LA (61%) apresentou menor quantidade de embriões clivados comparados aos outros grupos. A quantidade de blastocistos em dia 7 de desenvolvimento e blastocistos totais formados, também foi significativamente menor no grupo LA (28% e 28% respectivamente), sendo o grupo LS o

único que apresentou resultados semelhantes aos testes realizados com a amostra espermática do controle positivo (Tabela 8).

Tabela 8 – Porcentagem de estruturas embrionárias no teste *in vitro* de amostra espermática bovina criopreservada nos diferentes diluidores – Cravinhos - SP - 2012

Diluidores	Classificação embrionária (%)		
	<i>Clivados</i> ¹	<i>Blastocistos D7</i> ²	<i>Blastocistos totais</i> ³
Controle positivo	84 ^a	56 ^a	58 ^a
Lecitina de Soja	78 ^a	40 ^b	44 ^b
Lecitina de Soja + Ácido Ascórbico	61 ^b	28 ^c	28 ^c
Lecitina de Soja + SOD	84 ^a	45 ^{a, b}	48 ^{a, b}
Gema de Ovo	79 ^a	42 ^b	44 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

¹ $P=0,003$; ² $P=0,01$; ³ $P=0,005$

SOD – Superóxido dismutase

A tabela 9 mostra os resultados obtidos a partir da avaliação da motilidade espermática realizada durante o processo de fertilização *in vitro*. É possível verificar que não houve diferença significativa de motilidade inicial e intermédia entre os grupos experimentais, apenas demonstrou maior motilidade, as células espermáticas do grupo controle positivo, que após 24 horas de procedimento se igualou aos demais grupos (motilidade final).

Tabela 9 - Médias $\pm$ erros padrão da média da motilidade espermática durante o teste de fertilidade *in vitro* de amostra espermática bovina criopreservada nos diferentes diluidores – Cravinhos - SP - 2012

Diluidores	Motilidade espermática (%)		
	<i>Inicial</i> ¹	<i>Intermédia</i> ²	<i>Final</i> ³
Controle positivo	57,50 $\pm$ 2,50 ^a	80,00 $\pm$ 0 ^a	28,75 $\pm$ 3,75
Lecitina de Soja	36,25 $\pm$ 7,46 ^b	60,00 $\pm$ 5,77 ^b	30,00 $\pm$ 0
Lecitina de Soja + Ácido Ascórbico	32,50 $\pm$ 2,50 ^b	55,00 $\pm$ 5,00 ^b	26,25 $\pm$ 6,25
Lecitina de Soja + SOD	28,75 $\pm$ 4,73 ^b	55,00 $\pm$ 2,88 ^b	27,50 $\pm$ 4,33
Gema de Ovo	28,75 $\pm$ 5,15 ^b	60,00 $\pm$ 7,07 ^b	22,50 $\pm$ 2,50

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

¹ $P=0,05$; ² $P=0,04$; ³ $P=0,53$

SOD – Superóxido dismutase

Discussão

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher."

Cora Coralina

7 DISCUSSÃO

7.1 Discussão – Experimento 1 – Avaliação e criopreservação de amostras espermáticas bovinas

7.1.1 Efeito dos diluidores na criopreservação espermática

O uso de diluidores que não possuam proteínas de origem animal em sua composição é uma boa opção para reduzir as barreiras sanitárias na comercialização de amostras seminais. Nos últimos anos, diversos foram os estudos que compararam a qualidade seminal após o uso de diluidores com e sem produtos de origem animal e a maioria dos resultados encontrados foram a favor dos diluidores compostos por proteína animal (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000; CELEGHINI et al., 2008).

É sabido que os danos causados pelo processo de criopreservação alteram diversas características espermáticas, uma delas é a morfologia, sabe-se também que de acordo com o diluidor e crioprotetor utilizado, esses danos podem ser reduzidos (O'CONNEL; MCCLURE; LEWIS, 2002).

Os resultados deste experimento demonstraram que as células espermáticas não apresentaram alterações na morfologia de peça intermediária quando criopreservadas em diluidor lecitina em relação à gema de ovo. Assim como, a proteção exercida sobre a integridade do flagelo espermático foi semelhante para ambos os grupos, sendo encontradas alterações de 6,55% para gema de ovo e 4,55% para lecitina de soja. Essa alteração espermática está relacionada, principalmente, ao choque térmico sofrido pela célula durante o processo de congelamento (RONOT; AUGER, 1990), segundo Watson (1981) o diluidor que melhor protege a célula espermática contra o choque frio é aquele à base de gema de ovo, no entanto, não foi o que se observou no presente estudo.

A qualidade do sêmen criopreservado pode ser avaliada por uma variedade de testes laboratoriais, incluindo as análises da integridade das membranas celulares plasmática, acrossomal e mitocondrial, que são vitais para a viabilidade espermática (AMANN; PICKETT, 1987). Segundo Valcárcel et al. (1994), a integridade da membrana plasmática é o marcador mais sensível da viabilidade espermática de carneiros e da estimativa da sobrevivência celular pós-descongelamento a 37°C, já que a correlação encontrada em estudo comparativo foi positiva ($r=0,64$) entre a motilidade após 8 horas de incubação a 37°C e integridade de membrana plasmática logo após a descongelamento.

O efeito dos diluidores do presente experimento, sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal, não foi diferente entre os grupos GO e LE, porém podem ser encontradas na literatura divergências em relação a essa variável.

Por um lado, Van Wagtendonk-De Leeuw et al. (2000), Celeghini et al. (2008) e Zaffalon (2009) entre outros autores, relataram que células criopreservadas com diluidores à base de gema de ovo obtiveram maior proteção de suas membranas que aquelas criopreservadas com lecitina de soja, afirmando que a lipoproteína de baixa densidade presente na gema de ovo é responsável pela proteção da membrana durante a criopreservação. Por outro lado outros autores afirmam que a proteção de membrana é exercida de melhor forma por diluidores à base de lecitina de soja.

O efeito dos diluidores gema e lecitina foi avaliado sobre a integridade de membranas espermáticas de amostras seminais bovinas, pela técnica de microscopia eletrônica, e os resultados encontrados foram maior quantidade de células intactas no diluidor à base de lecitina de soja (Biociphos®) (AMIRAT et al., 2005). Da mesma maneira, em trabalho realizado por Gil et al. (2000) o percentual de membranas intactas foi de 65,4% para diluidor gema de ovo e 87,6% para diluidores lecitina de soja ($P<0,05$), ainda observaram que a reação acrossomal ocorreu mais intensamente nas células criopreservadas com gema de ovo (7,2%) do que com lecitina de soja (4,7%).

A morfologia espermática, motilidade e atividade mitocondrial são igualmente prejudicadas com o processo de criopreservação (O'CONNELL; MCCLURE; LEWIS, 2002). Segundo Watson (1995), os componentes dos diluidores espermáticos podem aumentar ou diminuir a proteção de certos compartimentos celulares, como por exemplo, a membrana mitocondrial. Neste estudo, o potencial da atividade mitocondrial não foi afetado pelos

componentes dos diluidores, tanto gema de ovo ($76,90 \pm 2,90$) como lecitina de soja ($69,50 \pm 3,73$) apresentaram valores semelhantes após o uso do corante DAB para tal avaliação.

Uma vez mais, foi encontrado por Celeghini et al. (2008) e Zaffalon (2009) maior atividade mitocondrial em células criopreservadas com diluidores à base de gema de ovo. Corroborando esses resultados, foi relatado recentemente que após a adição de lecitina de soja em sêmen *in natura* de ovino houve diminuição do potencial mitocondrial, diferente do observado após a adição de gema de ovo ao diluidor, além disso, após a congelação, apenas células criopreservadas com gema de ovo apresentaram bons parâmetros de atividade mitocondrial, chegando à conclusão de que a lecitina de soja induziu a mitocôndria a sérios danos que claramente afetaram sua atividade (DEL VALLE et al., 2012).

Ao contrário, Seidman et al. (2002) defendem o efeito da lecitina de soja sobre a proteção mitocondrial, afirmando que esse produto é capaz de estabilizar a membrana mitocondrial, ativar seus mecanismos próprios de proteção e proteger seu DNA contra os danos oxidativos.

Ou seja, é sabido que a gema de ovo, devido aos seus constituintes, protege as membranas celulares de maneira quase única, difícil de sua eficiência ser alcançada por outros componentes do diluidor seminal. No entanto, essa mesma eficiência na proteção de membrana celular, na manutenção da atividade mitocondrial e também na proteção contra alterações morfológicas de peça intermediária exercida pelo diluidor à base de lecitina de soja, verificado no presente estudo, podem ser explicadas com base no trabalho de Seidman et al. (2002). Tal trabalho relata que a lecitina de soja por ser composta de fosfatidilcolina poli-insaturada e por conter componentes básicos para as funções energéticas e estruturais de todas as membranas biológicas, tem um importante papel na proteção e fluidez das membranas celulares, ainda promovem a atividade de uma série de enzimas essenciais ao metabolismo e proteção celular, incluindo a adenilato ciclase e a superóxido dismutase.

A suscetibilidade espermática ao estresse oxidativo induzido foi significativamente maior em amostras seminais criopreservadas com lecitina de soja ($595,40 \pm 103,73$) que com gema de ovo ($255,23 \pm 36,19$). Corroborando, Van Wagtendonk-De Leeuw et al. (2000) afirmaram que amostras seminais criopreservadas com lecitina de soja sofrem mais ação das espécies reativas de oxigênio que amostras criopreservadas com diluidores gema de ovo.

Ainda, em estudo realizado por Zaffalon (2009), no qual foi realizada a criopreservação de amostras seminais bovinas com diluidores produzidos com gema de ovo (Botu-Bov®) e lecitina de soja (AndroMed®) foi verificado maior índice de peroxidação lipídica (C11-BODIPY) em amostras criopreservadas com lecitina de soja.

A maior peroxidação lipídica encontrada em diluidores à base de lecitina de soja pode ser explicada pela tese de Moussa et al. (2002), onde foi sugerido que a concentração de LDL nos diluidores à base de lecitina de soja, não seja suficiente para ligar-se à maioria das moléculas de proteínas-BSP e proteger a membrana espermática contra a peroxidação lipídica, diferente do que ocorre com o uso de gema de ovo.

O uso de diluidor à base de LDL e lecitina de soja foi empregado na criopreservação de sêmen bovino, seguido de avaliação por microscopia eletrônica e foi concluído que o LDL protegeu melhor as células durante o processo de criopreservação (AMIRAT et al., 2005). Alguns pesquisadores questionam a possibilidade de adição de LDL em diluidores lecitina de soja (MOUSSA et al., 2002), no entanto, esse processo iria adicionar proteínas animais ao diluidor, o que iria contra ao desejado de sintetizar um diluidor totalmente livre de produtos de origem animal.

Alguns autores afirmam que o núcleo espermático é uma estrutura estável e menos afetada pela criopreservação, já que foi verificado que a criopreservação de sêmen humano não afetou a integridade da cromatina mesmo em congelamento rápida sem crioprotetor (WATSON, 1995; DUTY et al., 2002). No entanto, outros autores afirmam que a criopreservação do sêmen bovino causa alterações nos espermatozoides, sobrecondensação de DNA e apoptose espermática, sendo que a desnaturação da cromatina causada pela criopreservação é influenciada pelo diluidor, uma vez que a alteração da composição do diluidor ou modificação na sequência de adição dos componentes melhorou a qualidade seminal pós-descongelamento (KARABINUS; EVENSON; KAPROTH, 1991; ANZAR; BUHR, 2002).

Após a análise da suscetibilidade da cromatina à desnaturação, por SCSA, os resultados do presente experimento demonstraram maior proteção de DNA nos espermatozoides criopreservados com lecitina de soja ($0,61 \pm 0,09$) do que nas células criopreservadas com gema de ovo ($2,61 \pm 0,41$). No entanto, é importante ressaltar que para que um touro seja considerado subfértil, o DFI de seus espermatozoides deve variar entre 10% e 20% (EVENSON; WIXON, 2006), sendo que no presente estudo a maior fragmentação

de DNA atingiu o nível de aproximadamente 2%, podendo não causar grandes impactos na fertilidade dessas amostras seminais.

Em estudo realizado por Celeghini et al. (2008), apesar de não haver sido encontrada nenhuma diferença na fragmentação da cromatina entre os diluidores lecitina de soja (Bioxcell® - $1,02 \pm 0,09\%$) e gema de ovo (Botu-Bov® - $1,2 \pm 0,1\%$), o único diluidor que aumentou a fragmentação do DNA em relação ao sêmen *in natura* ($0,8 \pm 0,07\%$) foi o diluidor gema de ovo. Em estudo com sêmen humano, Reed et al. (2009) afirmaram que a lecitina de soja pode substituir, eficientemente, os diluidores à base de gema de ovo para a criopreservação espermática, isso porque não foram encontradas diferenças na qualidade espermática quanto à motilidade, morfologia e integridade de DNA. Ainda, em sêmen ovino criopreservado, a desnaturação do DNA foi significativamente maior nas células criopreservadas com diluidor à base de gema de ovo ($2,03 \pm 0,29\%$) do que com diluidor à base de lecitina de soja ($0,88 \pm 0,11\%$; $P=0,001$) (KHALIFA; LYMBEROPOULOS, 2013).

Em trabalho recente foi verificado retardo na perda de audição, induzida pela idade, após terapia oral com lecitina de soja, sugerindo que os componentes fosfolipídicos da lecitina de soja protegeram o DNA mitocondrial contra os danos oxidativos (SEIDMAN et al., 2002). Portanto, o efeito protetor da lecitina de soja sobre o DNA poderia ser explicado pela mesma hipótese do trabalho citado anteriormente, já que faltam estudos que elucidem o mecanismo de ação pelo qual a lecitina de soja protege o DNA espermático contra a fragmentação (BRANCO et al., 2010).

Há décadas, a avaliação da motilidade espermática vem sendo adotada como primeiro aspecto espermático a ser analisado durante o exame andrológico, isso porque, essa variável já foi correlacionada com o potencial fertilizante da amostra espermática (TURNER, 2003). A menor motilidade de células espermáticas criopreservadas com lecitina de soja em relação à gema de ovo é uma das ocorrências mais relatadas na literatura (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000; CELEGHINI et al., 2008; ZAFFALON, 2009).

Em estudo com sêmen bovino, foram verificados menores valores para motilidade total e motilidade progressiva em diluidor preparado com lecitina de soja (31,4%; 24,9%, respectivamente) e maior valor em diluidor com gema de ovo (61,2%; 49,2%, respectivamente) (CRESPILO et al., 2012).

Contudo, os percentuais de motilidade total (MOT) e motilidade progressiva (PROG) detectados pelo CASA não foram diferentes entre os grupos estudados GO ($27,85 \pm 3,54$; $16,00 \pm 2,34$, respectivamente) e LE ($19,35 \pm 2,86$; $10,85 \pm 1,63$, respectivamente). O mesmo foi verificado por Reed et al. (2009) em sêmen humano criopreservado com gema de ovo ($36,4 \pm 14,2$) e lecitina de soja ($28,8 \pm 8,6$) e por Gil et al. (2000) em células espermáticas bovinas (49,3% para gema e 51,2% para lecitina), para a variável motilidade.

Contrariando os resultados obtidos, Aires et al. (2003) encontraram taxa de motilidade mais alta ($P < 0,01$) em sêmen bovino criopreservado no diluidor lecitina de soja (73,5%) em comparação à gema de ovo (59,5%), assim como Amirat et al. (2005), que demonstraram motilidade de 64,1% para lecitina de soja e 31,8% para gema de ovo.

A análise computadorizada fornece cálculos mais precisos da velocidade e trajetória de cada célula espermática, os quais se correlacionam positivamente com a fertilidade, sendo assim, quanto maior a combinação de variáveis do CASA, mais alta será a correlação com a fertilidade (FARRELL et al., 1998). As variáveis: velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), frequência de batimentos espermáticos (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e movimentos rápidos (RAPID) têm sido relacionadas com a qualidade espermática, e quanto maior o valor numérico encontrado, melhor é a amostra espermática (ARRUDA, 2000).

O efeito do diluidor gema de ovo sobre as velocidades espermáticas avaliadas nesse experimento, mostrou menores valores para VAP e VCL em comparação com o efeito da lecitina de soja. Esse achado pode estar relacionado com a menor densidade encontrada nos diluidores à base de lecitina, bem como, maior quantidade de grumos e partículas provenientes da gema de ovo. Referente a esse ponto, Mortimer (1997) relatou que o aumento da viscosidade do meio espermático externo resulta em diminuição da amplitude da onda flagelar.

Ainda, Amirat, Tainturier e Jeanneau (2004) observaram valores mais altos para VCL e VAP para um diluidor contendo LDL (mais viscoso) do que para outro contendo gema de ovo (menos viscoso), sendo que igualmente ao presente experimento, também não encontraram diferença para VSL entre os dois diluidores estudados. Da mesma maneira, em trabalho realizado por Zaffalon (2009), valores de VAP e VCL foram maiores com o uso do diluidor lecitina de soja.

A frequência de batimentos espermáticos (BCF) foi maior no grupo gema de ovo, contrário aos achados de O'Connel, McClure e Lewis (2002) e Zaffalon (2009) e igualmente encontrado por Celeghini et al. (2008), sugerindo que componentes presentes nesse diluidor estariam estimulando a frequência dos batimentos.

As demais variáveis estudadas: ALH, STR, LIN e RAPID não foram diferentes entre os grupos gema de ovo e lecitina de soja, sendo contrário ao encontrado por diversos autores. Um ponto divergente verificado em muitos estudos foi a variável ALH, em uma avaliação geral o deslocamento lateral de cabeça do espermatozoide não é desejado, já que pode interferir na progressão da célula, no entanto, para Amirat, Tainturier e Jeanneau (2004) e Zaffalon (2009), a gema de ovo aumenta os valores de ALH da célula espermática, enquanto que para Gil et al. (2000) e Celeghini et al. (2008) a lecitina de soja é responsável por esse aumento.

Em um estudo, a variável STR foi maior para diluidor à base de lecitina de soja (ZAFFALON, 2009) em outro foi maior para gema de ovo (CELEGHINI et al., 2008). Ainda, a variável linearidade (LIN) foi menor com o uso de lecitina de soja em diversos trabalhos (GIL et al., 2000; AMIRAT; TAINTURIER; JEANNEAU, 2004; CELEGHINI et al., 2008; ZAFFALON, 2009).

Por fim, células espermáticas bovinas, criopreservadas com diluidor à base de gema de ovo apresentaram movimentos mais rápidos (RAPID) do que aquelas criopreservadas com lecitina de soja (57,29% e 29,19%, respectivamente) (CRESPILHO et al., 2012). Vale lembrar sobre a dificuldade de comparação dos resultados obtidos pela análise computadorizada da motilidade espermática entre distintos trabalhos devido à configuração (SETUP) usada em cada uma das pesquisas realizadas.

Dessa forma, pôde ser verificado que os parâmetros relacionados com o movimento espermático (VAP, VSL, VCL, STR, LIN) sofrem o efeito de diluidores de diferentes origens (animal ou vegetal) e diferentes viscosidades, ainda, entre diluidores de mesma origem a cinética celular pode ser alterada devido cada um de seus constituintes. Sendo assim, para uma avaliação mais consistente, o ideal seria sempre comparar tais variáveis em amostras seminais diluídas com diluidores de mesma composição.

7.1.2 Efeito do ácido ascórbico na criopreservação espermática

Muitos pesquisadores avaliaram os efeitos de diferentes antioxidantes na diluição de sêmen de mamíferos (BALL; VO, 2001; MARQUES et al., 2002). No presente experimento várias análises laboratoriais foram realizadas para verificar se o diluidor à base de lecitina de soja adicionado de antioxidante seria capaz de manter a qualidade espermática após a criopreservação espermática, de maneira superior ou semelhante ao efeito obtido com o uso da gema de ovo.

A vitamina-C é um antioxidante solúvel em água e protege o espermatozoide dos danos causados pelos radicais livres, garantindo sua motilidade e sua viabilidade (VERMA; KANWAR, 1998). O mecanismo de ação antioxidante da vitamina-C ocorre por sua capacidade redutora como doadora de elétron. Tal vitamina é chamada de antioxidante, pois ao doar seus elétrons previne que outros compostos sejam oxidados (BIELSKI; RICHTER; CHAN, 1975).

Sistemicamente, a vitamina-C atua principalmente na prevenção da formação de hidroperóxidos no plasma sanguíneo, sendo importante também para a proteção das membranas celulares (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Ainda, o ácido ascórbico afeta positivamente a integridade da estrutura tubular do flagelo espermático, sendo encontrado correlação positiva entre concentração de vitamina-C no plasma seminal e espermatozoides morfológicamente normais, sugerindo que a suplementação dessa substância na dieta pode exercer efeito protetor sobre o epidídimo (MICHAEL et al., 2008). Da mesma maneira foi verificado que, em coelhos, o ácido ascórbico é um importante fator para a manutenção da fisiologia dos testículos, epidídimos e glândulas acessórias (YOUSEF, 2005).

No presente experimento, o tratamento com vitamina-C também não apresentou diferenças em relação à morfologia de peça intermediária (2,05%) quando comparado com o diluidor gema de ovo (1,20%). Por outro lado, na característica morfológica cauda fortemente dobrada/enrolada o ácido ascórbico foi significativamente melhor que a gema de ovo ($4,35 \pm 1,06$ e $6,55 \pm 0,88$, respectivamente, $P=0,01$), demonstrando maior proteção

celular contra o choque térmico causado durante a criopreservação. No entanto, tal efeito não foi tão grave a ponto de causar diferenças em relação aos defeitos espermáticos maiores e totais entre os grupos LA e GO.

Em trabalho realizado com sêmen caprino congelado, a adição do antioxidante vitamina-C ao diluidor TRIS, protegeu a morfologia espermática (MEMON et al., 2012). Como também encontrado em sêmen canino criopreservado, houve maior proteção da morfologia espermática após a adição do ácido ascórbico (MONTEIRO et al., 2009). Dessa maneira, a influência benéfica do ácido ascórbico pode ser atribuída ao fato de este composto ser um excelente antioxidante, um sistema eficiente de combate às espécies reativas de oxigênio e ainda protetor estrutural do espermatozoide bovino (YOSHIMOTO et al., 2008).

A integridade das membranas espermáticas, plasmática e acrossomal, foi mantida igualmente após a criopreservação celular tanto com o diluidor lecitina de soja + ácido ascórbico, quanto com o diluidor gema de ovo ($P=0,25$, para membrana plasmática e $P=0,16$, para membrana acrossomal).

Outro importante mecanismo de ação da vitamina-C é na recuperação da vitamina-E, substância presente nas células espermáticas e plasma seminal que, por sua natureza lipídica, penetra nas membranas biológicas e assume um papel importante na linha de defesa antioxidante das membranas celulares, pois não necessita estar associada a nenhuma outra substância para bloquear a cascata de peroxidação lipídica. O radical α -tocoferoxil formado da reação da vitamina E é reduzido pelo ácido ascórbico e volta para a sua forma original de vitamina-E, reiniciando o processo de proteção das membranas (NEUZIL; THOMAS; STOCKER, 1997).

Semelhante ao encontrado neste estudo, Nichi (2009) constatou não haver diferenças na proteção das membranas espermáticas entre grupos de células criopreservadas com gema de ovo e gema de ovo adicionado de vitamina-C (4,5mM), em sêmen de epidídimo bovino. Bem como, não foram encontradas diferenças em sêmen canino criopreservado com diluidor TRIS-ácido cítrico controle e adicionados de três concentrações diferentes de ácido ascórbico (EULENBERGER; SCHAFER-SOMI; AURICH, 2009).

Em pesquisa de Marques et al. (2002), não houve nenhum efeito do ácido ascórbico sobre a membrana acrossomal de espermatozoide equino refrigerado em diluidor à base de lactose-gema. Já, segundo Hu et al. (2010) a adição de 4,5mg/mL de ácido ascórbico ao meio TRIS-gema, aumentou significativamente a proteção das membranas plasmática e acrossomal em sêmen bovino criopreservado.

As espécies reativas de oxigênio possuem efeitos opostos sobre as células do organismo, em baixas concentrações são essenciais para a realização de algumas atividades orgânicas, incluindo a estabilização da membrana mitocondrial em bovino, porém, em altas concentrações o efeito é prejudicial a todas estruturas e funções celulares (GONÇALVES et al., 2010).

A suplementação do diluidor seminal com ácido ascórbico exerce efeito positivo sobre a motilidade espermática, integridade de membranas e potencial mitocondrial (PEÑA et al., 2003), porém, em altas concentrações, ele pode exercer um papel pró-oxidante por alimentar a reação de Fenton. Foote, Brockett e Kaproth (2002) reportaram que altas concentrações de ácido ascórbico foram prejudiciais para a motilidade espermática após a criopreservação de sêmen bovino.

Em trabalho realizado por Nichi (2009), a suplementação com 4,5mM de ácido ascórbico ao diluidor gema de ovo, por um lado não interferiu no alto potencial mitocondrial, por outro diminuiu significativamente a porcentagem de células com baixo potencial. Já, Li et al. (2010) constataram melhora no potencial mitocondrial, após a adição de 300µM de vitamina-C em diluidor de sêmen humano.

No entanto, no presente experimento, o efeito do ácido ascórbico (59,00%) sobre o alto potencial mitocondrial foi prejudicial em relação ao efeito da gema de ovo (76,90%, $P=0,03$). Podendo ser explicado por duas hipóteses: a concentração de ácido ascórbico foi excessiva, assumindo o papel pró-oxidante, ou o ácido ascórbico exerceu sua função antioxidante, porém bloqueando o papel fisiológico das ROS.

A suplementação de ácido ascórbico ao diluidor seminal reduz o efeito deletério das espécies reativas de oxigênio no espermatozoide bovino (HU et al., 2010). Em amostras seminais criopreservadas de homens férteis, a adição de 300µM de vitamina-C diminuiu significativamente os níveis de ROS (LI et al., 2010). Em amostras seminais coletadas de

epidídimo bovino e pelo método de eletroejaculação em touros mestiços, os níveis de TBARS e de MDA também foram reduzidos após a adição de ácido ascórbico (NICHII, 2009; PAUDEL et al., 2010). Ainda, Jewo et al. (2012) demonstraram que o tratamento com ácido ascórbico é uma boa opção para atenuar os danos testiculares causados por queimaduras severas, sendo considerada uma substância com potente capacidade antioxidante.

Dessa maneira, ao contrário do que era esperado, a adição de antioxidante ao diluidor seminal, não diminuiu a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) das amostras seminais, sendo encontrada menor concentração de TBARS para o grupo gema de ovo ($255,23 \pm 36,19$) do que para o grupo lecitina + ácido ascórbico ($640,36 \pm 88,35$, $P=0,0004$). Os resultados mostram que o efeito do ácido ascórbico neste estudo ocorreu sem que houvesse a diminuição da peroxidação lipídica, sugerindo que sua capacidade de proteção celular envolva mecanismos distintos da sua atividade antioxidante.

Estudos de Hughes et al. (1998) demonstraram que a privação espermática à antioxidantes leva à desnaturação da cromatina após a criopreservação, e que a suplementação com α -tocopherol e ácido ascórbico podem evitar tais danos. Corroborando tal afirmação, pesquisa acerca da fertilidade humana demonstrou que pacientes com baixos níveis de ácido ascórbico seminal apresentaram alta porcentagem de espermatozoides com DNA anormal (SONG; NORKUS; LEWIS, 2006).

Muitos autores correlacionam a proteção da vitamina-C ao DNA espermático, à sua ação antioxidante, capacidade de redução das ROS e diminuição dos danos oxidativos à cromatina (DONNELLY; MCCLURE, LEWIS, 1999b; SIERENS; HARTLEY; CAMPBELL, 2002; AGARWAL; SEKHON, 2010). Porém, no presente estudo foi visto menor índice de fragmentação de DNA no grupo do diluidor lecitina de soja + ácido ascórbico (0,51%) do que no grupo do diluidor gema de ovo (2,61%, $P= 0,0001$), concomitante ao maior nível de TBARS no grupo LA. Essa característica pode indicar que tal efeito protetor ao DNA esteja associado à outro mecanismo além de sua ação antioxidante.

Desde 1974, Bedford e Calvin discutem a possibilidade dos antioxidantes não-enzimáticos atuarem na célula espermática abrindo a cadeia dissulfídica e levando à condensação da cromatina, o que dificulta sua fragmentação. Em contrapartida, Ménéz et al. (2007) deparou-se com um efeito inesperado, diminuição do índice de fragmentação de

DNA e aumento da descondensação da cromatina espermática após o uso de vitamina-C. No entanto, ao comparar os grupos LE e LA da presente pesquisa, não foram verificadas diferenças nos valores de SCSA, podendo-se atribuir o efeito protetor da cromatina espermática ao diluidor lecitina de soja e não ao antioxidante.

Diferente de Marques et al. (2002) e Li et al. (2010) que verificaram aumento da motilidade espermática após a adição de vitamina-C, no presente experimento não foi exercido efeito algum sobre a motilidade total (MOT), motilidade progressiva (PROG) e movimentos rápidos (RAPID) da célula espermática, avaliados pelo CASA. Este resultado apoia a ideia de que a motilidade espermática pode ser um processo independente da atividade mitocondrial, como já havia sido proposto em estudos com diversas espécies (MUKAI; OKUNO, 2004; MARTIN et al., 2007).

Variáveis como VAP, VCL foram maiores para células criopreservadas com lecitina de soja + ácido ascórbico que para gema de ovo ($P=0,001$; $P=0,001$; $P=0,0006$, respectivamente). Segundo Ciereszko e Dabrowski (1995), a adição de ácido ascórbico em amostras seminais reduz significativamente a aglutinação das células espermáticas, o que facilita a mobilidade celular, no entanto, no presente experimento, por não haver diferenças significativas entre os grupos LE, LA e LS esse resultado pode ser atribuído apenas à menor viscosidade do meio lecitina de soja em comparação ao meio gema de ovo.

Por um lado não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos LA e GO para as variáveis VSL e BCF, por outro lado, as variáveis STR e LIN foram maiores no grupo GO do que no grupo LA. Em trabalho de Hu et al. (2010) a adição de ácido ascórbico aumentou a porcentagem de VSL, LIN, VAP e ALH das células espermáticas criopreservadas de bovinos.

7.1.3 Efeito da superóxido dismutase na criopreservação espermática

O antioxidante superóxido dismutase (SOD) pode ser encontrado naturalmente no plasma seminal e nas células espermáticas, é uma enzima que possui papel fundamental na proteção, intra e extracelular, contra a ação das espécies reativas de oxigênio, sua adição ao

sêmen tem provado melhor manutenção e melhora das características espermáticas (THIANGTUM et al., 2009). A SOD é responsável pela produção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) a partir de duas moléculas do ânion superóxido (O_2^-), ou seja, a dismutação do ânion superóxido, daí o nome dado à enzima: superóxido dismutase (ALVAREZ et al., 1987), além de proteger a hiperativação prematura e a capacitação induzida pelos radicais livres antes da ejaculação (LAMIRANDE; GAGNON, 1995).

A atividade da enzima superóxido dismutase foi avaliada em amostras seminais de homens férteis (normozoospermicos) e inférteis (oligoastenozoospermico), sendo verificada maior atividade de SOD no grupo de pacientes férteis, além disso, foi demonstrada correlação positiva entre a atividade de SOD e a qualidade de parâmetros seminais como concentração e motilidade espermáticas, atribuindo a pior qualidade seminal à deficiência de tal enzima (MURAWSKI et al., 2007).

Corroborando esse dado encontrado, Pasqualotto et al. (2006) também verificaram correlação positiva entre atividade de SOD e concentração espermática ($r=0,303$, $P=0,012$) e entre a atividade de SOD e motilidade ($r=0,295$, $P=0,014$). Apesar de muitos estudos comprovarem o efeito benéfico da SOD sobre a qualidade espermática, Aitken e Baker (2006) verificaram que altos níveis de SOD estavam associados à função espermática defeituosa devido à alta suscetibilidade das células ao efeito do H_2O_2 .

No presente experimento, os efeitos da adição da enzima superóxido dismutase ao sêmen bovino foram semelhantes ao efeito encontrado com o uso da gema de ovo no diluidor em diversas variáveis estudadas como, por exemplo, morfologia espermática, alto potencial mitocondrial, frequência de batimentos espermáticos, entre outras.

Segundo Câmara et al. (2011), a adição de SOD ao diluidor de sêmen ovino protegeu as membranas celulares durante o processo de criopreservação. O diluidor à base de lecitina de soja adicionado de SOD, neste experimento, mostrou boa proteção das características morfológicas do espermatozoide, tanto contra os danos de peça intermediária, quanto os danos de dobramento de cauda, não sendo diferente da proteção exercida pela gema de ovo e ainda, sendo mais eficiente que a lecitina de soja isolada e a lecitina de soja associada ao ácido ascórbico, na proteção de peça intermediária. Pasqualotto et al. (2006) encontraram correlação positiva entre atividade de SOD e boa morfologia em amostras seminais de homens férteis ($r=0,434$, $P=0,012$).

Para respiração celular de todo um organismo mais de 90% do oxigênio é consumido pela cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias e aproximadamente 5% desse oxigênio é liberado na forma de O_2^- e H_2O_2 (MACMILLAN-CROW; CRUTHIRDS, 2001). A adição de superóxido dismutase ao diluidor lecitina de soja manteve o alto potencial mitocondrial das células espermáticas sem diferenças significativas em relação ao diluidor à base de gema de ovo (59,00% para LS e 76,90% para GO).

Em experimento realizado por Nichi (2009), também foi encontrada melhora da atividade mitocondrial de células espermáticas após a adição da enzima SOD ao meio de diluição e criopreservação (gema de ovo) de amostras seminais de epidídimo bovino. Também foi constatado por Silva et al. (2011), melhora na atividade mitocondrial após a adição de 100UI/mL de SOD ao diluidor à base de gema, para criopreservação de sêmen ovino.

Alguns estudos afirmaram o efeito benéfico que a SOD exerce sobre o alto potencial mitocondrial, motilidade espermática e frequência de batimento de flagelo (AITKEN; BUCKINGHAM; HARKISS, 1993; HONG et al., 1994; AITKEN; PATERSON; FISHER, 1995). Esse efeito benéfico da SOD sobre a atividade mitocondrial pode ser explicado pelo fato de que o ânion superóxido produzido pela mitocôndria durante o processo de respiração, seja catalisado pela SOD, protegendo a integridade das mitocôndrias contra os danos oxidativos.

O sistema antioxidante controla o balanço entre a produção e a neutralização das espécies reativas de oxigênio e a proteção espermática contra os danos oxidativos (GRIVEAU; LE LANNOU, 1997). Em experimento realizado por Alvarez et al. (1987), foram encontradas altas correlações entre a atividade da SOD, o índice de peroxidação espontânea ($r=-0,97$) e o tempo de perda de motilidade ($r=0,87$), em amostras seminais humanas, indicando que a SOD é o principal mecanismo de proteção contra a peroxidação lipídica em humanos.

Ainda, o presente estudo obteve como resultado maior nível de TBARS no grupo LS (564,13 ng/ 10^6 spz) que no grupo GO (255,23 ng/ 10^6 spz, $P=0,0004$). Em trabalho de Nichi (2009) foi verificado que após a adição de SOD ao diluidor seminal, houve aumento da resistência espermática ao estresse oxidativo induzido em relação ao grupo controle (gema de ovo). Resultado semelhante foi encontrado por Kankofer et al. (2005), após a adição de superóxido dismutase ao diluidor de sêmen equino houve aumento da qualidade

espermática, porém, sem que os níveis de TBARS se diferenciasssem entre os grupos com e sem antioxidante. Isso pode indicar que a peroxidação lipídica pode não ser o principal fator que influencie a viabilidade seminal durante sua diluição, refrigeração e congelção.

Apesar de alguns estudos demonstrarem maior efeito da SOD na proteção do DNA espermático, nenhuma diferença foi encontrada entre amostras seminais criopreservadas com diluidor controle e aqueles suplementados com SOD (NICHII, 2009; CHATDARONG et al., 2012). No presente experimento foram verificados menores índices de fragmentação de DNA nas células espermáticas criopreservadas com o diluidor à base de lecitina de soja + superóxido dismutase que naquelas criopreservadas com diluidor gema de ovo, no entanto, como já descrito anteriormente, por não haver diferença entre os grupos LE e LS para a variável estudada, essa proteção do DNA pode ser conferida à base do diluidor (lecitina de soja) e não ao antioxidante.

Ao contrário do que foi observado em estudo com sêmen equino refrigerado (COCCHIA et al., 2011), a adição de SOD ao diluidor seminal do presente experimento não alterou a motilidade (total e progressiva) em comparação com os grupos lecitina de soja ou gema de ovo. Em estudo realizado acerca do efeito da adição da SOD em sêmen canino e sêmen bovino criopreservados, também não foram verificadas diferenças para a variável motilidade (NICHII, 2009; CHATDARONG et al., 2012).

Segundo Kobayashi et al. (2001), a adição de SOD à suspensão seminal reduziu a perda da motilidade e a concentração de MDA de amostra espermática humana. Neste estudo, para as demais variáveis avaliadas pelo CASA, foram verificados maiores valores de VAP, VSL, VCL e ALH para o grupo LS em comparação com o grupo GO. Apesar de Câmara et al. (2011) atribuir maior porcentagem de células com VCL e ALH à atividade antioxidante da superóxido dismutase, no presente experimento, esse efeito pode ser explicado pela menor viscosidade do meio lecitina de soja, onde se encontra diluída tal enzima, já que não houve diferença entre os grupos LS e LE.

A variável frequência de batimentos espermáticos foi semelhante entre os grupos gema de ovo e lecitina+SOD. Em trabalho realizado por Hong et al. (1994), foi adicionado sulfato ferroso em amostra espermática humana de modo a induzir a peroxidação lipídica. Esse evento causou a diminuição da frequência dos batimentos do flagelo espermático, porém, foi revertido após a adição (dose-dependente) da enzima superóxido dismutase.

Concluindo que ao combater a peroxidação lipídica essa enzima melhora a qualidade da cinética espermática.

Portanto, diversos foram os estudos que avaliaram o efeito da suplementação de antioxidantes ao diluidor seminal sobre a qualidade espermática pós-descongelamento, porém vale lembrar que em todos os estudos a base do diluidor estudado era sempre da mesma composição, sendo comparado entre controle e adicionado de AOX, enquanto no presente estudo foram comparados diluidores de diferentes composições (gema de ovo e lecitina de soja suplementada com AOX).

7.2 Discussão – Experimento 2 – Avaliação da fertilidade *in vivo* de amostras espermáticas bovinas

As duas principais preocupações na produção bovina em relação à inseminação artificial são: o controle na transmissão de patógenos pelos diluidores e o controle de qualidade das amostras seminais criopreservadas (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000). Uma alternativa para controlar a transmissão de patógenos por meio do diluidor foi disposta pela Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organization for Animal Health*) recomendando, em 2003, que produtos de origem animal usados no processamento de sêmen deveriam ser livres de quaisquer patógenos ou ainda utilizar produtos que não fossem de origem animal para a manipulação seminal (CRESPILO et al., 2012).

Quando as amostras seminais são manipuladas, tanto para programas de inseminação artificial, quanto para programas de fertilização *in vitro* elas são expostas à altos níveis de oxigênio e à luminosidade, o que não ocorre naturalmente, e que pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio e à vários danos celulares (FOOTE; BROCKETT; KAPROTH, 2002). Sob essas condições, surgiram tanto possibilidades de substituição dos diluidores à base de produtos de origem animal, como também de suplementação oral ou local com antioxidantes visando a melhora na qualidade seminal (BECONI et al., 1993).

Foi verificado por Hiwasa et al. (2009) e Kulaksiz, Cebi e Akcay (2012) menor taxa de fertilidade para o grupo tratado com lecitina de soja, assim como afirmado por Crespilho et al. (2012), o diluidor à base de lecitina de soja representa uma alternativa para o desenvolvimento de diluidores quimicamente definidos e livres de patógenos, porém, não protege as células espermáticas com eficiência, já que a taxa de prenhez (bovino) foi de 62,37% para gema de ovo contra 36,45% para lecitina de soja.

Em contrapartida, Aires et al. (2003) verificaram que a taxa de prenhez (bovino) foi significativamente maior no grupo de animais inseminados com amostras criopreservadas em lecitina de soja (70%) do que no grupo de animais inseminados com diluidor gema de ovo (68%, $P < 0,0001$).

Fukui et al. (2008) verificaram taxa de prenhez semelhante entre os grupos estudados: gema de ovo (64,5%) e lecitina de soja (56,7%) após a inseminação artificial de ovelhas. Assim como Khalifa e Lymberopoulos (2013), que também não encontraram diferença significativa na taxa de prenhez em ovelhas inseminadas com amostras criopreservadas em lecitina de soja (50%) e gema de ovo-leite (41%). Ainda, Gil et al. (2000) não encontraram diferenças significativas na taxa de prenhez em grupos de fêmeas bovinas inseminadas com amostras criopreservadas em gema de ovo (Triladyl® - 69,1%) e lecitina de soja (Biociphos® - 69,2%).

Uma alternativa, que surgiu há alguns anos, para garantir boa taxa de prenhez, foi o tratamento com antioxidantes, isolados ou combinados, que se têm mostrado eficientes para o aumento na taxa de gestação em casais de pacientes com problemas de fertilidade (AGARWAL et al., 2004).

Em estudo com humanos, 69 pacientes foram suplementados com selênio associado às vitaminas A, C e E, após o período de tratamento foi verificado aumento de 11% na taxa de gestação, no entanto, é importante observar que o aumento na taxa de fertilidade nem sempre vem acompanhado de melhora na qualidade espermática (SCOTT; MACPHERSON; YATES, 1998).

O efeito de alguns antioxidantes, adicionados ao diluidor seminal, sobre a taxa de fertilidade também foi avaliado em estudos com animais, após inseminação artificial em tempo fixo de ovelhas da raça Santa Inês, Silva et al. (2011) constataram que não houve

diferença na taxa de fertilização entre os grupos controle (gema de ovo – 66,67%), e os grupos que receberam SOD (87,50%) e glutathione reduzida (GSH – 58,34%).

Apesar de resultados divergentes entre alguns relatos, o presente experimento demonstrou semelhança na taxa de prenhez entre todos os grupos estudados: lecitina de soja (LE – 58,33%), lecitina de soja + ácido ascórbico (LA – 60,48%), lecitina de soja + superóxido dismutase (LS – 54,29%) e gema de ovo (GO – 62,39%, $P=0,65$). Esses dados demonstraram a falta do efeito antioxidante e a eficiência da lecitina de soja sobre a taxa de prenhez após a IATF. Por um lado indica que o próprio sistema antioxidante encontrado no trato reprodutor feminino, provavelmente se encarregue de exercer algum efeito sobre as amostras seminais. Por outro lado, essa ausência de diferença significativa indica que tais diluidores à base de lecitina de soja, podem ser usados como substitutos do diluidor à base de gema de ovo sem acarretar perdas na taxa de fertilidade.

Adicionalmente, Anel et al. (2006) avaliaram quimicamente o diluidor AndroMed® (lecitina de soja), o mesmo utilizado no presente estudo, e reportaram que a lecitina de soja utilizada na composição deste diluidor contém grande quantidade de fosfolípidos semelhantes ao encontrado na gema de ovo, o que explicaria bons resultados deste diluidor em relação à outros também à base de lecitina de soja.

7.3 Discussão – Experimento 3 – Avaliação da fertilidade *in vitro* de amostras espermáticas bovinas

É sabido que fatores espermáticos são responsáveis pelas primeiras divisões embrionárias. Estudos demonstraram que existe influencia paterna direta em relação ao índice de blastocisto produzido (COMMIZZOLI et al., 2000). Em estudo realizado em 2006, Fatehi et al. induziram danos no DNA espermático em bovinos e observaram, após a PIV que as células que apresentavam alteração de DNA não perderam a capacidade de fecundação, porém relataram que houve bloqueio do desenvolvimento embrionário após a 2ª e 3ª clivagem. Esses achados reforçam ainda mais o conhecimento sobre a necessidade de

manter ao máximo a qualidade espermática após o processo de criopreservação, a partir do uso de diluidores adequados e de suplementos, quando necessários.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos gema de ovo e lecitina de soja nas avaliações embrionárias (taxa de embriões clivados, taxa de blastocisto D7 e taxa de blastocistos totais) deste presente estudo. Isso mostra que a lecitina de soja protegeu as células espermáticas eficientemente a ponto de não afetar a taxa de fertilidade tanto *in vivo* como *in vitro*. Assim como o encontrado por Aires et al. (2003), após o teste de penetração à zona pelúcida não houve diferenças entre as amostras criopreservadas com lecitina de soja ou gema de ovo.

Além disso, como já relatado em diversos estudos, as espécies reativas de oxigênio tem um efeito negativo sobre a qualidade seminal, qualidade oocitária e sobre o desenvolvimento embrionário (FUJITANI et al., 1997; PERIS et al., 2007; GONÇALVES et al., 2010). Em condições naturais, o genoma de gametas e zigotos é constantemente submetido ao ataque das espécies reativas de oxigênio, porém, durante o processo de reprodução assistida, como por exemplo a PIV, a manipulação faz com que as células fiquem ainda mais expostas ao oxigênio e mais susceptíveis ao ataque das ROS (MÉNÉZO et al., 2007).

Há discrepâncias em relação à necessidade de espécies reativas de oxigênio durante o processo de maturação *in vitro* (MIV), fertilização e desenvolvimento embrionário. Foi observado que baixas concentrações de ROS são necessárias para os eventos de reação acrossomal, capacitação espermática e ligação com a zona pelúcida, enquanto que altas concentrações das espécies reativas de oxigênio, formada devido à grande quantidade de glicose presente no meio de maturação, exercem um efeito negativo desde o início do desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (HASHIMOTO et al., 2000).

Em estudo conduzido por Gonçalves et al. (2010) foi demonstrado que as ROS são essenciais na capacidade de fertilização do espermatozoide bovino, assim como na interação entre oócito e espermatozoide, sendo que a adição de antioxidante ao meio de FIV diminuiu a qualidade espermática, a formação normal do pronúcleo e o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto.

Muitos estudos foram conduzidos com a finalidade de observar a ação de antioxidantes adicionados ao meio de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* (DALVIT;

CETICA; BECONI, 1998; GONÇALVES et al., 2010), no entanto, poucas foram as pesquisas acerca da criopreservação do espermatozoide em meio contendo antioxidante e seu efeito sobre a taxa de fertilização *in vitro*, como foi estudado no presente experimento, no qual a adição de antioxidante ao diluidor seminal apresentou efeitos controversos sobre o sucesso de tal processo.

O ácido ascórbico possui funções antagônicas, dependendo de sua concentração e em qual meio está presente pode atuar como pró-oxidante devido sua capacidade de reduzir metais (Fe^{2+} e Cu^+) formando produtos que iniciam a peroxidação lipídica, ou pode também exercer a função de antioxidante, cuja eficiência foi provada após a criopreservação de espermatozoide bovino em diluidor contendo ácido ascórbico, o qual foi capaz de preservar o metabolismo, atividade e viabilidade celular (BECONI et al., 1993).

O efeito antioxidante da vitamina-C está relacionado diretamente com a regeneração da vitamina-E a partir da redução do radical tocoferil (HALLIWELL, 1991). Baixas concentrações de α -tocoferol permitem a produção fisiológica das ROS, que são essenciais para a capacitação espermática, reação acrossomal e para o processo de fertilização *in vitro*, o aumento da concentração de vitamina-E pela ação do ácido ascórbico pode alterar as características de membrana plasmática e reduzir ou impedir a produção das espécies reativas de oxigênio necessárias para tal processo (DALVIT; CETICA; BECONI, 1998). Além disso, há estudos que relatam que o ácido ascórbico em níveis excessivos está associado à inibição da estereidogênese ovariana, declínio da fertilidade e aumento da taxa de abortamento (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999a).

Apesar de haver sido verificado por Dalvit et al. (1998, 2005), que a adição de ácido ascórbico ao meio de cultivo *in vitro* não diferiu do grupo controle em relação às taxas de maturação oocitária, oócitos fertilizados e blastocisto, no presente experimento a avaliação dos dados sobre as taxas de embriões clivados (61%, $P=0,003$), blastocisto D7 (28%, $P=0,01$) e blastocistos totais (28%, $P=0,005$), revelou que a vitamina-C adicionada ao diluidor seminal à base de lecitina de soja interferiu negativamente no processo de PIV.

Existem três hipóteses que poderiam explicar o efeito negativo da vitamina-C em tal processo: **1.** A concentração de ácido ascórbico não foi a ideal para ser usada durante a produção *in vitro* de embriões, sendo mais elevada que o necessário, a ponto de exercer um papel pró-oxidante; **2.** A concentração de vitamina-C está adequada, no entanto a função

antioxidante de tal substância fez com que aumentassem os níveis de vitamina-E e essa por sua vez bloqueou o efeito fisiológico das ROS sobre a fertilização, já que em experimento de Dalvit, Cetica e Beconi (1998) a adição de vitamina-E no meio de FIV de bovino interferiu negativamente com o processo; e por fim, **3**. A vitamina-C adicionada ao diluidor seminal fez com que houvesse descondensação da cromatina espermática o que prejudica o desenvolvimento embrionário durante a reprodução assistida (MÉNÉZO et al., 2007).

Essa última hipótese pode ser suportada pelo estudo no qual a administração oral de vitamina-C reduziu a fragmentação de DNA espermático, no entanto aumentou sua descondensação em 25%. O aumento no grau de descondensação do DNA espermático reflete como um efeito negativo sobre a regulação da ativação do gene paterno durante o desenvolvimento embrionário inicial, que pode resultar em fragmentação citoplasmática no embrião durante o processo de fertilização *in vitro* (HAAF; WARD, 1995).

Em pesquisa realizada com FIV e ICSI (injeção espermática intracitoplasmática) em humanos, não ocorreu nenhuma gestação quando o grau de descondensação do DNA espermático foi maior que 28% (MÉNÉZO et al., 2007).

Em células de mamíferos há um sistema enzimático de proteção antioxidante (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase), que atuam na neutralização das ROS e no controle dos danos causados pela peroxidação lipídica. Este sistema antioxidante também foi detectado no complexo cumulus-oócito de bovinos (CETICA et al., 2001), onde também foi verificado, que altos níveis de ROS causam o bloqueio da meiose do oócito (DOWNS; MASTROPOLO, 1994).

Foi documentado que a adição de antioxidantes ao meio de maturação oocitária, como beta-mercaptoetanol, ácido ascórbico e superóxido dismutase exerceu efeito negativo durante o processo de PIV (BLONDIN; COENEN; SIRARD, 1997). Contrariamente, foi publicado por Fujitani et al. (1997) dados que demonstraram que a adição de SOD juntamente com hipotaurina ao meio de cultivo, melhorou significativamente a taxa de blastocisto formado. Anos depois foi reportado que a adição de antioxidantes que possuem como alvo a mitocôndria (SOD, catalase) podem diminuir alterações no DNA de espermatozoides que são mantidos no meio para produção *in vitro* de embriões (LAMOND; WATKINSON; RUTHERFORD, 2003).

No presente estudo o grupo suplementado com superóxido dismutase apresentou taxas de desenvolvimento embrionário semelhantes ao grupo gema de ovo, indicando que a proteção espermática em tal grupo foi tão eficiente quanto no diluidor gema de ovo. No entanto, vale ressaltar que o único grupo estudado que apresentou semelhança ao grupo controle positivo, foi aquele suplementado com superóxido dismutase. Nesse sentido, a associação de lecitina de soja e superóxido dismutase pode ser considerado como meio ótimo para ser usado no processo de fertilização *in vitro* de amostras bovinas. Segundo Seidman et al. (2002), a fosfatidilcolina presente no diluidor lecitina de soja tem importante papel na ativação de várias enzimas presentes na membrana celular, entre elas, a superóxido dismutase.

7.4 Considerações finais

Apesar de diversos trabalhos haverem vinculado o diluidor à base de lecitina de soja à baixa qualidade seminal pós-descongelamento, no presente experimento verificou-se que o diluidor à base de lecitina de soja utilizado (AndroMed®) apresentou efeito de proteção espermática semelhante ao diluidor à base de gema de ovo (Triladyl®). Sendo pouco eficiente na preservação de apenas algumas características funcionais celulares, ainda apresentou taxa de prenhez (*in vivo*) e taxa de desenvolvimento embrionário (*in vitro*) tão boas quanto às obtidas a partir do uso de gema de ovo como componente principal na criopreservação das células espermáticas bovinas.

A adição de antioxidantes ao meio responsável pela diluição e criopreservação das células espermáticas é uma alternativa para melhorar o processo de preservação das características celulares e até mesmo aumentar o potencial fertilizante de uma amostra. O ácido ascórbico mostrou-se eficiente tanto para a preservação da qualidade dos parâmetros funcionais do espermatozoide, quanto para atingir taxa de prenhez aceitável em um programa de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em uma propriedade rural. No entanto, um resultado obtido despertou interesse em relação à vitamina-C e a produção *in vitro* de embriões, a baixa taxa de desenvolvimento embrionário observado somente no grupo que continha tal antioxidante. Isto pode indicar que o ácido ascórbico está agindo no DNA espermático, promovendo a descondensação de sua cromatina e prejudicando todo o processo da fertilização *in vitro*, fato esse que normalmente não ocorre no processo natural de fecundação, já que o próprio oócito possui mecanismos capazes de “corrigir” danos simples na estrutura do DNA espermático.

Em contrapartida, a enzima superóxido dismutase (SOD) desempenhou um papel satisfatório na manutenção da qualidade do espermatozoide bovino. Os resultados obtidos a partir da avaliação de todas as variáveis seminais demonstraram que esse diluidor apresentou efeito semelhante à gema de ovo na proteção celular, além disso, a capacidade fertilizante da amostra espermática criopreservada com a SOD foi igualmente mantida. Após a IATF, as taxas de prenhez obtidas, assim como os demais grupos, foram aceitáveis para

esse tipo de biotecnologia da reprodução, já o resultado após a fertilização *in vitro* foi o que confirmou a eficiência dessa associação. Além de o desenvolvimento embrionário haver sido semelhante ao encontrado com o uso de gema de ovo no diluidor, o LS foi o único grupo que não apresentou diferenças com o controle positivo utilizado na avaliação.

Dessa maneira, um passo a mais foi dado na incessante busca pelo diluidor de sêmen ideal, aquele que não contenha produtos de origem animal, que possua sua composição estritamente bem definida e que, principalmente, mantenha a qualidade, a funcionalidade e o potencial fertilizante das amostras seminais criopreservada.

Sendo assim, a partir dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que o diluidor à base de lecitina de soja suplementado com o antioxidante superóxido dismutase seria uma opção para a substituição definitiva dos diluidores à base de gema de ovo, derrubando as barreiras sanitárias que freiam a comercialização internacional de amostras criopreservadas de sêmen bovino.

Conclusão

"Foi o tempo que investiste em tua rosa que fez tua rosa tão importante"

Antoine de Saint-Exupéry

8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que:

- ✓ A adição do antioxidante ácido ascórbico ao diluidor à base de lecitina de soja manteve a morfofuncionalidade e fertilidade *in vivo* de espermatozoide bovino criopreservado;
- ✓ A adição do antioxidante superóxido dismutase ao diluidor à base de lecitina de soja manteve a morfofuncionalidade e fertilidade, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, de espermatozoide bovino criopreservado. Tais características seminais foram semelhantes ao efeito exercido pelo uso de diluidor à base de gema de ovo.

Referências

*"Vista pelos jovens, a vida é um futuro infinitamente longo; vista pelos velhos, um
passado muito breve"*

Schopenhauer

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 18, p. 325–332, 2006.
- AGARWAL, A.; NALLELLA, K. P.; ALLAMANENI, S. S. R.; SAID, T. M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 8, n. 6, p. 616–627, 2004.
- AGARWAL, A.; SEKHON, L. H. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. **Human Fertility**, v. 13, n. 4, p. 217–225, 2010.
- AIRES, V. A.; HINSCH, K. D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 269–279, 2003.
- AITKEN, J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioessays**, v. 16, p. 259–267, 1994.
- AITKEN R. J.; BAKER M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1, p. 66–69, 2006.
- AITKEN, R. J.; BARKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 191–194, 2002.
- AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of a 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, p. 441–450, 1993.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 183–197, 1989.
- AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, J.; IRVINE, D. S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1037–1046, 1998.
- AITKEN, R. J.; PATERSON, M.; FISHER, H. et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 2017–2025, 1995.
- ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L.; STOREY, B. T. Spontaneous 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.; HAMMERSTEDT, R. H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 397–406, 1993.

- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-174, 1987.
- AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINURIER, D.; CHATAGNON, G.; BATTUT, I.; COURTENS, J. L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction**, v. 129, p. 535-543, 2005.
- AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O.; COURTENS, J.L.; ANTON, M. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 895-907, 2004.
- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; DE PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 30-42, 2006.
- ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relation with fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 354-360, 2002.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (casa) e da morfometria (asma)**. 2000. 134 f. Tese (Livre docência em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- BAFANA, A.; DUTT, S.; KUMAR, A.; KUMAR, S.; AHUJA, P. S. The basic and applied aspects of superoxide dismutase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 129-138, 2011.
- BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2000.
- BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061-1069, 2001.
- BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v.2011, p. 1-7, 2010.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: University Press, 1989, p. 285.
- BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2003.

- BECONI, M. T.; FRANCA, C. R.; MORA, N. G.; AFFRANCHINO, M. A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p. 841-851, 1993.
- BEDFORD, J. M.; CALVIN, H. I. The occurrence and possible functional significance of S-S-crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. **Journal of Experimental Zoology**, v. 188, p. 137-155, 1974.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1338-1344, 2006.
- 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.
- BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, I. C.; SIRARD, M. A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-286, 2001.
- BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRAND, M. A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 25, p. 383-391, 1973.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M. A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 454-460, 1997.
- BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B. ; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, p. 699-706, 1998.
- BRANCO, C. S.; GARCEZ, M. E.; PASQUALOTTO, F. F.; ERDTMAN, B.; SALVADOR, M. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. **Cryobiology**, v. 60, p. 235-237, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produção Animal, Exportação e Importação - 2013**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno/producao>>. Acesso em: 23 abr. 2013.
- BUCAK, M. N.; ATEŞŞAHİN, A.; VARIŞLI, O.; YÜCE, A.; TEKİN, N.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, p. 1060-1067, 2007.
- BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIÖZKAN, S.; BAŞPINAR, N.; TAŞPINAR, M.; COYAN, K.; BİLGİLİ, A.; AKALIN, P. P.; BÜYÜKLEBLEBİCİ, S.; AYDOS, S.; ILGAZ, S.; SUNGUROĞLU, A.; ÖZTUNA, D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v. 61, p. 248-253, 2010.

- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods of Enzymology**, v. 52, n. 1, p. 302-310, 1978.
- CÂMARA, D. R.; SILVA, S. V.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; GUERRA, M. M. P. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v. 76, p. 342-350, 2011.
- CBRA. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.
- CELEGHINI, E. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.
- CENTOLA, G. M. Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. **Archives of Andrology**, v. 36, p. 1-7, 1996.
- CETICA, P.; PINTOS, L.; DALVIT, G.; BECONI, M. Antioxidant enzyme activity and oxidative stress in bovine oocyte *in vitro* maturation. **IUBMB Life**, v. 51, p. 57-64, 2001.
- CHABOT, F.; MITCHELL, J. A.; GUTTERIDGE, J. M.; EVANS, T. W. Reactive oxygen species in acute lung injury. **The European Respiratory Journal**, v. 11, n. 3, p. 745-757, 1998.
- CHAN, A. C.; CHOW, C. K.; CHIU, D. Interaction of Antioxidants and Their Implication in Genetic Anemia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 222, n. 3, p. 274-282, 1999.
- CHATDARONG, K.; CHAIVECHAKARN, A.; THUWANUT, P.; PONGLOWHAPAN, S. Effects of cold storage prior to freezing on superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities, level of total reactive oxygen species and sperm quality in dogs. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 47, n. 6, p. 274-277, 2012.
- CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin-C: an across season study. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 982-988, 1995.
- COCCHIA, N.; PASOLINI, M. P.; MANCINI, R.; PETRAZZUOLO, O.; CRISTOFARO, I.; ROSAPANE, I.; SICA, A.; TORTORA, G.; LORIZIO, R.; PARAGGIO, G.; MANCINI, A. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 75, p. 1201-1210, 2011.
- COMIZZOLI, P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HEYMAN, Y.; RENARD, J. P. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1677-1684, 2000.
- CRISPILHO, A. M.; SÁ FILHO, M. F.; DELL'AQUA JR, J. A.; NICHI, M.; MONTEIRO, G. A.; AVANZI, B. R.; MARTINS, A.; PAPA, F. O. Comparison of *in vivo* and *in vitro* fertilizing potential of bovine smen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. **Livestock Science**, v. 149, p. 1-6, 2012.

- DALVIT, G.; CETICA, P.; BECONI, M. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v. 49, p. 619-627, 1998.
- DALVIT, G.; LLANES, S. P.; DESCALZO, A.; INSANI, M.; BECONI, M.; CETICA, P. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 93-97, 2005.
- DAWSON, E. B.; HARRIS, W. A.; TETER, M. C.; POWELL, L. C. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. **Fertility and Sterility**, v. 58, p. 1034-1039, 1992.
- DEL VALLE, I.; GÓMEZ-DURÁN, A.; HOLT, W. V.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Soy Lecithin Interferes With Mitochondrial Function in Frozen-Thawed Ram Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 4, p. 717-725, 2012.
- 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, 1999a.
- DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation *in vitro* on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. **Mutagenesis**, v. 14, p. 505-512, 1999b.
- DOWNS, S. M.; MASTROPOLO, A. M. The participation of energy substrates in the control of meiotic maturation in murine oocytes. **Developmental Biology**, v. 162, p. 154-168, 1994.
- DUTY, S. M.; SINGH, N. P.; RYAN, L.; CHEN, Z.; LEWIS, C.; HUANG, T.; HAUSER, R. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. **Human Reproduction**, v. 17, n. 5, p. 1274-1280, 2002.
- EULENBERGER, K.; SCHÄFER-SOMI, S.; AURICH, C. Effect of different concentrations of ascorbic acid on motility, membrane integrity and chromatin status of frozen-thawed canine spermatozoa within six hours of storage at 37 degrees C. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 254-258, 2009.
- 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.
- EVENSON, D. P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 979-991, 2006.
- FARREL, P. B.; PRESICCE, G. A.; BROCKETT, C. C.; FOOTE, R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, p. 871-979, 1998.
- FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p.176-188, 2006.

- FAZELI, A. R.; STEENWEG, W.; BEVERS, M. M.; DELOOS, F. A. M.; VANDEN BROEK, J.; COLENBRANDER, B. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull sperm. **Veterinary Record**, v. 132, p. 14–16, 1993.
- FOOTE, R. H.; BROCKETT, C. C.; KAPROTH, M. T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 13-23, 2002.
- FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S. M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H. R.; NASR-ESFAHANI, M. H. *In vitro* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 480-487, 2010.
- FRAGA, C. G.; MOTCHNIK, P. A.; SHIGENAGA, M. K.; HELBOCK, H. J.; JACOBS, R. A.; AMES, B. N. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 11003-11006, 1991.
- FUJITANI, Y.; KASAI, K.; OHTANI, S.; NISHIMURA, K.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 483-489, 1997.
- FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after Artificial Insemination Using a Soybean-Based Semen Extender in Sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n. 4, p. 286-289, 2008.
- GADEA, J.; SELLES, E.; MARCO, M. A.; COY, P.; MATAS, C.; ROMAR, R.; RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, v. 62, p. 690–701, 2004.
- GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M. CH.; HAARD, M. G. M.; JOHANISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Functional Sperm Parameters and Fertility of Bull Semen Extended in Biociphos Plus® and Triladyl®. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, p. 69-77, 2000.
- GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v. 59, p. 1157–70, 2003.
- GONÇALVES, F. S.; BARRETTO, L. S. S.; ARRUDA, R. P.; PERRI, S. H. V.; MINGOTI, G. Z. Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 129-135, 2010.
- GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v. 20, p. 61–9, 1997.
- GROSSFELD, R.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; FRENZEL, A.; MAXWELL, W. M.; RATH, D. New aspects of boar semen freezing strategies. **Theriogenology**, v. 70, p. 1225–1233, 2008.
- HAAF, T.; WARD, D. C. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by *in situ* hybridization and extended chromatin fibres. **Experimental. Cell Research**, v. 219, p. 604–611, 1995.

- 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.
- HAMMERSTED, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-78, 1990.
- HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M.; IMAI, H. Excessive concentration of glucose during *in vitro* maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. **Molecular Reproduction and Development**, v. 56, p. 520-526, 2000.
- HERRERO, M. B.; LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 419-425, 2003.
- HIWASA, M.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; OKABE, K.; FUKUI, Y. Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v. 16, p. 447-454, 2009.
- HOLT, C.; HOLT, W. V.; MOORE, H. D.; REED, H. B.; CURNOCK, R. M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 312-23, 1997.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.
- HONG, C. Y.; CHAO, H. T.; TSAI, K. L.; NG, H. T. Evaluation of human sperm motility by means of trans-membrane migration method and computer assisted semen analysis: a comparasion study. **Andrologia**, v. 23, p. 7-10, 1991.
- HONG, C. Y.; LEE, M. F.; LAI, L. J.; WANG, C. P. Effect of lipid peroxidation on beating frequency of human sperm tail. **Andrologia**, v. 26, p. 61-65, 1994.
- 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.
- HU, J. H.; TIAN, W. Q.; ZHAO, X. L.; ZAN, L. S.; WANG, H.; LI, Q. W.; XIN, Y. P. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 72-77, 2010.
- HUGHES, C. M.; LEWIS, S. E. M.; MCKELVEY-MARTIN, V. J.; THOMPSON, W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Human Reproduction**, v. 13, p. 1240-1247, 1998.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v.40, p. 1-70, 2012.
- IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 57, p. 2409-2416, 1992.

- JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; HAARD, M.G.M; HAARD, M.Ch.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in sweden. **Theriogenology**, v. 52, p. 641-58, 1999.
- JEWOW, P. I.; DURU, F. I.; FEDEYIBI, I. O.; SAALU, L. C.; NORONHA, C. C. The protective role of ascorbic acid in burn-induced testicular damage in rats. **Burns**, v. 38, p. 113-119, 2012.
- JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acids peroxides, and protective action of seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v. 31, p. 531-537, 1979.
- KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 63, p. 1354-1365, 2005.
- KARABINUS, D. S.; EVENSON, D. P.; KAPROTH, M. T. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. **Journal of Dairy Science**, v.74, n. 11, p. 3836-3848, 1991.
- KATO, M.; MAKINO, S.; KIMURA, H.; OTA, T.; FURUHASHI, T.; NAGAMURA, Y. Evaluation of mitochondrial function and membrane integrity by dual fluorescent staining for assessment of sperm status in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 11-18, 2001.
- KHALIFA, T.; LYMBEROPOULOS, A. Changeability of sperm chromatin structure during liquid storage of ovine semen in milk-egg yolk- and soybean lecithin-based extenders and their relationships to field-fertility. **Cell Tissue Bank**, v. 14, n. 4, p. 687-698, 2013.
- KOBAYASHI, H.; GIL-GUZMAN, E.; MAHRAN, A. M.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. N.; THOMAS JR, A. J.; AGARWAL, A. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 568-574, 2001.
- KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation of fertilization. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 151-157, 1996.
- KULAKSIZ, R.; CEBL, C.; AKCAY, E. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4°C. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 36, p. 177–182, 2012.
- LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. **Free Radicals Biology & Medicine**, v. 18, n. 3, p. 487–495, 1995.
- LAMIRANDE, E.; LECLERC, P.; GAGNON, C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 175–194, 1997.
- LAMOND, S.; WATKINSON, M.; RUTHERFORD, T.; LAING, K.; WHITING, A.; SMALLWOOD, A.; NARGUND, G.; CAMPBELL, S.; BANERJEE, S. Gene-specific chromatin damage in human spermatozoa can be blocked by antioxidants that target mitochondria. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 7, p. 407–418, 2003.

- LARSON, K. L.; DEJONGE, C. J.; BARNES, A. M.; JOST, L. K.; EVENSON, D. P. **Sperm** chromatin structure **assay** parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. **Human Reproduction**, v. 15, n. 8, p. 1717-722, 2000.
- LEVINE, M.; MORITA, K. Ascorbic acid in endocrine systems. **Vitamins & Hormones**, v. 42, n. 64, 1985.
- LI, Z.; LIN, Q.; LIU, R.; XIAO, W.; LIU, W. Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 5, p. 437-444, 2010.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J.; NEMCOVA, L.; MBAYE, A.; KINGSTON, M.; WADE, M.; DUTTY, P.; BOLAND, M. P. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**, v. 126, n. 3, p. 337-346, 2003.
- LU, K. H.; GORDON, I.; GALLAGHER, M.; MCGORVERN, H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. **Veterinary Research**, v. 121, p. 259-260, 1987.
- LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production *in vivo* by glutathione-containing culture media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 437-443, 1996.
- MACMILLAN-CROW, L. A.; CRUTHIRDS, D. L. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. **Free Radical Research**, v. 34, p. 325-336, 2001.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1250-1258, 2002.
- MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R.; UMA, J.. Purification of four gelatinbinding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. **Bioscience Reports**, v. 7, p. 231-238, 1987.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipidbinding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, p. 109-119, 2002.
- MARQUES, A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GOBESSO, A. A. O.; NEVES NETO, J. R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved sêmen submitted to *in vitro* incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.
- MARTIN, G.; CAGNON, N.; SABIDO, O.; SION, B.; GRIZARD, G.; DURAND, P.; LEVY, R. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 22, p. 380-388, 2007.
- MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 5, p. 83-104, 2000.

- MEDEIROS, C. M. O.; FORREL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 237-344, 2002.
- MEMON, A. A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; GOH, Y. M.; EBRAHIMI, M.; NADIA, F. M. Effect of ascorbic acid concentrations, methods of cooling and freezing on boer goat semen cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 2, p. 325-330, 2012.
- MÉNÉZO, Y. J. R.; HAZOUT, A.; PANTEIX, G.; ROBERT, F.; ROLLET, J.; COHEN-BACRIE, P.; CHAPUIS, F.; CLÉMENT, P.; BENKHALIFA, M. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 14, n. 4, p. 418-421, 2007.
- MICHAEL, A. J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H. N.; BOSCOS, C. M. Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. **Theriogenology**, v. 70, n. 5, p. 827-835, 2008.
- MONTEIRO, J. C.; GONÇALVES, J. S. A.; RODRIGUES, J. A.; LÚCIO, C. F.; SILVA, L. C. G.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; VANNUCCHI, C. I. Influence of ascorbic acid and luteal antioxidants on frozen-thawed canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 359-362, 2009.
- MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.
- MOUSSA, M.; MATINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-706, 2002.
- MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 540-547, 2004.
- MURAWSKI, M.; SACZKO, J.; MARCINKOWSKA, A.; KOWSKA, A. C.; GRYBOOE, M.; BANAEOE, T. Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v. 45, n. 1, p. 123-126, 2007.
- 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. ½, p. 57-71, 1997.
- NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros**, 2009, 120 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- NISSEN, H. P.; KREYSEL, H. W. Superoxide dismutase in human semen. **Klinische Wochenschrift**, v. 61, p. 63-65, 1983.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

- O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, p. 704–709, 2002.
- O'FLAHERTY, C.; LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, p. 528–540, 2006.
- OHKAWA, H.; OHISH, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351–358, 1979.
- PAPA, F. O.; NEVES NETO, J. R.; FERREIRA, J. C. P.; ALVARENGA, M. A.; LEME, D. P. A comparative study between the freezability and fertility of stallion semen using different extenders *In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY*, 1998. Baltimore, Maryland. **Proceedings**. Baltimore: Society for Theriogenology, 1998. p. 155.
- PARKS, J. E. Hypothermia and Mammalian gametes, *In: KAROW, A. M.; CRITSER, J. K. (Ed.). Reproduction tissue banking: Scientific Principles*. San Diego: Academic Press, 1997. p. 229–261.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209–22, 1992.
- PASQUALOTTO, F. F.; PASQUALOTTO, E. B.; UMEZU, F. M.; SALVADOR, M. Seminal superoxide-dismutase and catalase activities in fertile and infertile men. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 50, n. 2, p. 130–134, 2006.
- PAUDEL, K. P.; KUMAR, S.; MEUR, S. K.; KUMARESAN, A. Ascorbic acid, catalase and chlorpromazine reduce cryopreservation-induced. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 45, p. 256–262, 2010.
- PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUES-MARTIZEZ, H. Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85–98, 2003.
- PERIS, S. I.; BILODEAU, J. F.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 878–892, 2007.
- POLGE, C.; ROWSON, L. E. A. Results with bull semen stored at -79°C. **Veterinary Record**, v. 64, p. 851–854, 1952.
- POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87–95, 1991.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 6, p. 215–225, 2006.
- PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915–923, 1995.

- RAJESH, K. T.; DORESWAMY, K.; SHRILATHA, B.; MURALIDHARA, M. Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice: induction of abnormal sperms and effects on fertility, **Mutation Research**, v. 513, p. 103–111, 2002.
- REED, M. L.; EZEH, P. C.; HAMIC, A.; THOMPSON, D. J.; CAPERTON, C. L. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 5, p. 1787-1790, 2009.
- RONOT, X.; AUGER, J. Flow and image cytometry for quality assessment of fresh and frozen human sperm samples. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2, p. 313-322, 1990.
- SAS INSTITUTE: SAS/STAT_ User's Guide. Release 8.2. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2001.
- SCOTT, R.; MACPHERSON, A.; YATES, R. W.; HUSSAIN, B.; DIXON, J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. **British Journal of Urology**, v. 82, p. 76–80, 1998.
- SEIDMAN, M. D.; KHAN, M. J.; TANG, W. X.; QUIRK, W. S. Influence of lecithin on mitochondrial DNA and age-related hearing loss. **Otolaryngology – Head and Neck Surgery**, v. 127, n. 3, p. 138-144, 2002.
- SIERENS, J.; HARTLEY, J. A.; CAMPBELL, M. J.; LEATHEM, A. J.; WOODSIDE, J. V. *In vitro* isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 22, p. 227–234, 2002.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A. J. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. **Theriogenology**, v. 67, p. 609-619, 2007.
- SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. P. *In vitro* and *in vivo* evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 46, p. 874-881, 2011.
- SONG, G. J.; NORKUS, E. P.; LEWIS, V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. **International Journal of Andrology**, v. 29, p. 569-575, 2006.
- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Principles of cryopreservation. In: COOLED AND FROZEN STALLION SEMEN, 1999, Fort Collins, Colorado: College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences of Colorado State University, 1999. p. 43-47.
- THIANGTUM, K.; PINYOPUMMIN, A.; HORI, T.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Effect of catalase and superoxide dismutase on motility, viability and acrosomal integrity of frozen-thawed cat spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 369-372, 2009.
- THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1087–1094, 2002.

TRIMECHE, A.; YVON, J.M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, p. 181-93, 1999.

TURNER, R. M. Tales from the tail: What do we really know about sperm motility?. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 6, p. 790-803, 2003.

VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; PEREZ, L. MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent sataining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of RAM spermatozoa. **Theriogelology**, v. 41, p. 438-89, 1994.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M.; HARING, R. M.; KAAL-LANSBERGEN, L. M. T. E.; DEN DAAS, J. H. D. Fertility Results Using Bovine Semen Cryopreserved With Extenders Based On Egg Yolk And Soy Bean Extract. **Theriogenology**, v. 54, p. 57-67, 2000.

VERMA, A.; KANWAR, K. C. Human sperm motility and lipid peroxidation in different ascorbic acid concentrations: an *in vitro* analysis. **Andrologia**, v. 30, n. 6, p. 325-329, 1998.

VIANA, J.H.; SIQUEIRA, L.G.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, L.S. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 2, p. 661-674, 2010.

WALLACE M, S. Canine reproduction: infertility in the male dog. **Problems in Veterinary Medicine**, v. 4, p. 531-544, 1992.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Paternal influence on time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility *in vivo*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 1, p. 47-55, 2001.

WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F.; PERIPATO, A. C.; VILA, R. A.; FIRMINO, F.; NOGUEIRA, M. F. G.; PUPIM, F. P. V.; LOBO, R. B. Taxa de prenhez de embriões bovinos produzidos *in vitro* após a vitrificação. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária, UFRGS**, Porto Alegre – RS, v. 24, p. 264, 1996.

WATANABE, Y. F.; WATANABE, M. R.; VILA, R. A.; GALERANI, M. A. V.; LOBO, R. B. The influence of B2 and modified CR-2 medium on the *in vitro* production of bovine embryos with cumulus and oviduct co-culture. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 259, 1999.

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

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

YOSHIMOTO, S.; OKADA, E.; UMEMOTO, H.; TAMURA, K.; UNO, Y.; NISHIDA-UMEHARA, C.; MATSUDA, Y.; TAKAMATSU, N.; SHIBA, T.; ITO, M. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 7, p. 2469-2474, 2008.

YOUSEF, M. I. Protective role of ascorbic acid to enhance reproductive performance of male rabbits treated with stannous chloride. **Toxicology**, v. 207, n. 1 p. 81-89, 2005.

ZAFFALON, F. G. **Alterações semelhantes à capacitação no sêmen bovino após a criopreservação utilizando diluidores à base de gema de ovo ou lecitina de soja**, 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ZINI, A.; LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 3, p. 183-188, 1993.