



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

# **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen eqüino**

**Juliana Lopes Almeida**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**BRASÍLIA/DF**  
ABRIL/2006

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do  
sêmen eqüino**

**Juliana Lopes Almeida**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Jairo Pereira Neves**  
**CO-ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> Margot Alves Nunes Dode**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PUBLICAÇÃO: 222/2006**

**BRASÍLIA/DF**  
**ABRIL/2006**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do  
sêmen eqüino**

**Juliana Lopes Almeida**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE  
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA,  
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE PRODUÇÃO ANIMAL.**

**APROVADA POR:**

---

**Jairo Pereira Neves, Doutor (FAV/UNB)  
(ORIENTADOR) CPF:06586350930 E-mail:jpneves@unb.br**

---

**Margot Alves Nunes Dode, Pós-doutora (EMBRAPA)  
(CO-ORIENTADOR) CPF: 395928980 E-mail:Margot@cenargen.embrapa.br**

---

**Rodolfo Rumpf, Pós- Doutor (EMBRAPA)  
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: E-mail:rodolfo@cenargen.embrapa.br**

---

**Cláudio Alves Pimentel, Doutor (Universidade Federal de Pelotas - UFPel)  
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 181051490-87 E-mail:pimentel.sul@terra.com.br**

**BRASÍLIA/DF, 24 de abril de 2006**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Juliana Lopes

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PLASMA SEMINAL  
NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUÍNO.**

Juliana Lopes Almeida; orientação de Dr Jairo Pereira Neves. Brasília, 2006

77 p. : il.

Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2006.

1. Criopreservação. 2. Equino 3. Estresse oxidativo 4. Plasma seminal 5. Viabilidade espermática. I. Neves, J. P. II. Dr

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, J.L. (2006) **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação de sêmen equino**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006, 77 p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Juliana Lopes Almeida

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado: Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação de sêmen equino

GRAU: Mestre ANO: 2006

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Juliana Lopes Almeida

CPF 87456338191

S.Q.N. 304 Bloco C apartamento 602

CEP 70736-030- Brasília/DF, Brasil

Telefone: (61) 33267512/ (61)81259377 E-mail: JLALMEIDA@UNB.BR

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta obra aos meus pais, por todo apoio e conforto que sempre tive nas horas difíceis, pela educação que me deram, pelos ensinamentos e lições de vida que certamente seguirei.

Ao meu irmão, que mesmo distante, sempre torceu por mim e me incentivou durante todos os momentos de minha vida.

Aos meus avós, tios e primos, que em horas de ansiedade me animaram com palavras de carinho.

Aos meus amigos, que sempre tiveram palavras de carinho e incentivo para comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

No momento em que avanço mais um degrau na escala do saber, rendo minhas homenagens àqueles que, na dificuldade, me ajudaram a transpor os obstáculos e a atingir meus objetivos.

Agradeço primeiramente a Deus, pelos dons que me concedeu e a graça de estar finalizando este mestrado em uma Universidade de ponta, como a Universidade de Brasília (UNB).

Em segundo lugar, agradeço ao meu orientador, Dr Jairo Pereira Neves, que não mediu esforços na dedicação e presteza, na orientação e acompanhamento deste trabalho.

Também agradeço à minha co-orientadora, Dra Margot Alves Nunes Dode, que colaborou e me orientou em todas as etapas deste trabalho, servindo-me de modelo de profissionalismo e dedicação à ciência.

Agradeço à minha família, pelo incentivo, apoio e compreensão pelas horas em que gostariam que estivéssemos juntos e não pude estar presente.

Agradeço ao Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia, liderada pelo Dr Rodolfo Rumpf, que colaborou nos contatos e execução, em convênio com a UNB, para a realização dos experimentos.

Agradeço ao Dr Marcelo Hermes-Lima, professor do departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, que cedeu o laboratório para as análises conclusivas do presente trabalho.

Agradeço ao doutorando, Roberto Andrade Júnior, do curso de Biologia Celular da Universidade de Brasília, que dedicou parte do seu tempo a me orientar e acompanhar nos trabalhos de estresse oxidativo.

Agradeço aos meus colegas de mestrado que colaboraram nos trabalhos de campo e de laboratório, Marina Ferreira Zimmermann, Thiago Antonio de Souza Nascimento Silva e Bianca Damiani Marques Silva.

Agradeço aos funcionários da EMBRAPA, que foram prestativos e dedicados tanto no campo quanto no laboratório.

## ÍNDICE

Capítulo	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Os espermatozóides.....	3
2.1.1. Membrana Plasmática.....	3
2.1.2. Capacitação.....	6
2.1.3. Reação Acrossômica.....	7
2.1.4. Integridade do DNA.....	8
2.2. A Criopreservação.....	9
2.3. Estresse oxidativo.....	13
2.4. Plasma Seminal.....	16
2.5. Avaliações “in vitro” do sêmen criopreservado.....	18
2.5.1. Motilidade e vigor.....	19
2.5.2. Morfologia espermática.....	20
2.5.3. Integridade de Membrana.....	20
2.5.4. Integridade de acrossoma.....	22
2.5.5. Integridade de DNA.....	22
2.5.6. Avaliação de estresse oxidativo.....	23
3. OBJETIVO GERAL.....	26
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
6. CAPÍTULO ÚNICO.....	46
EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PLASMA SEMINAL NA PROTEÇÃO CONTRA ESTRESSE OXIDATIVO E VIABILIDADE ESPERMÁTICA DURANTE A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUÍNO	
6.1. INTRODUÇÃO.....	50
6.2. MATERIAL E MÉTODO.....	51
6.2.1. Colheita e avaliação do sêmen.....	52
6.2.2. Processo de criopreservação.....	52
6.2.3. Descongelamento e avaliações.....	53
6.2.4. Morfologia Espermática.....	53
6.2.5. Avaliação de Integridade de Membrana Plasmática (IMP).....	54
6.2.6. Avaliação de Integridade de Acrossoma (IA).....	54
6.2.7. Avaliação de Integridade de DNA.....	55

6.2.8. Avaliação de Estresse oxidativo através do método de proteína carbonilada.....	55
6.2.9. Avaliação de Estresse oxidativo através do método de TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico).....	56
6.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	57
6.4. RESULTADOS.....	57
6.5. DISCUSSÃO .....	58
6.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
<b>Capítulo único</b>	
1. Médias ( $\pm$ desvio-padrão) da motilidade (%), vigor (0-5), percentagem (%) de células espermáticas morfolologicamente normais (N), com membrana plasmática íntegra (MPI), com cromatina íntegra (CI), e vivas com acrossoma íntegro (AI) em diferentes concentrações de plasma seminal (PS) no sêmen eqüino criopreservado.....	73
2. Médias ( $\pm$ desvio padrão) das percentagens de espermatozóides vivos com acrossomas intactos e reagidos e espermatozóides mortos com acrossomas intactos e reagidos em controle e diferentes concentrações de plasma seminal (PS) no sêmen eqüino criopreservado.....	74
3. Média ( $\pm$ desvio padrão) da percentagem de espermatozóides com membrana íntegra e lesada no controle e tratamentos com diferentes concentrações de plasma seminal (PS) no sêmen eqüino criopreservado.....	75
4. Média (desvio padrão) de peroxidação lipídica avaliada pela concentração de malondialdeído (MDA) e concentração de proteínas carboniladas lidas por nm de amostra no controle e diferentes concentrações de plasma seminal (PS) no sêmen eqüino criopreservado.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Capítulo único</b>	
1. Peroxidação lipídica medida através da leitura da concentração de MDA por $\mu\text{Mol}$ de amostra em controle e diferentes concentrações de plasma seminal de sêmen criopreservado de quatro garanhões.....	76
2. Concentração de proteínas carboniladas em controle e diferentes concentrações de plasma seminal de sêmen criopreservado de quatro garanhões.....	77

## **EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PLASMA SEMINAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQÜINO.**

### **RESUMO**

A baixa fertilidade é um dos fatores que restringe o uso da criopreservação de sêmen na espécie eqüina. Durante o congelamento, os espermatozóides sofrem vários danos, tais como alterações na membrana, capacitação prematura, alterações no DNA e estresse oxidativo. Os espermatozóides são suscetíveis ao estresse oxidativo devido, principalmente, à grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas suas membranas e pela baixa concentração de enzimas antioxidantes no seu citoplasma. A reduzida fertilidade, muitas vezes, tem sido correlacionada com a baixa capacidade antioxidante do sêmen e tal fato pode se dar devido à retirada do plasma seminal durante o processo de criopreservação. Estudos recentes têm demonstrado efeito benéfico do plasma seminal no armazenamento dos espermatozóides eqüinos submetidos ao resfriamento ou congelamento. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de plasma seminal na proteção contra o estresse oxidativo e danos na viabilidade da célula espermática. Foram utilizados 4 garanhões, sendo congeladas 4 partidas de cada animal. Após a colheita o plasma seminal foi retirado e os espermatozóides ressuspensos em diluente contendo diferentes concentrações de plasma 0% (T1), 5% (T2), 25% (T3) e 50% (T4). As análises realizadas pós-descongelamento foram motilidade, vigor, morfologia, integridade de membrana, integridade de acrossoma, integridade de DNA, peroxidação lipídica e proteína carbonilada. A adição de plasma seminal não afetou ( $p > 0,05$ ) a morfologia espermática e a integridade de DNA. Espermatozóides congelados com 5% de plasma seminal (T2) foram semelhantes ao controle (T1) em todas as variáveis estudadas ( $p > 0,05$ ), com exceção da peroxidação lipídica, que foi maior ( $p < 0,05$ ) no tratamento sem plasma (T1). O T4 apresentou menor ( $p < 0,05$ ) motilidade, vigor, percentagem de células com membrana íntegra e acrossoma intacto. Efeitos do plasma seminal na proteção contra oxidação de proteínas não foram observados

( $p > 0,05$ ). Em conclusão, o plasma seminal possui efeito antioxidante durante criopreservação, entretanto esse efeito não protege a viabilidade das células espermáticas de outros danos decorrentes da criopreservação, podendo, inclusive acentuar esses danos quando utilizado em concentrações de 25% ou mais.

**Palavras chaves:** criopreservação, eqüino, estresse oxidativo, plasma seminal, viabilidade espermática

## **EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF SEMINAL PLASMA ON CRYOPRESERVATION OF EQUINE SPERMATOZOA**

### **ABSTRACT**

One of the major limiting factors of equine frozen semen is the low fertility obtained. During freezing process spermatozoa undergoes a series of damages such as changes in membrane components, premature capacitation, chromatin damages and oxidative stress. Sperm cells are very susceptible to oxidative stress due to high concentration of polyunsaturated fatty acids in the membrane and low concentration of antioxidant enzymes in their cytoplasm. It has been shown that there is a correlation between low antioxidant capacity of semen and fertility of the animal and it may be due to seminal plasma removal during cooling or freezing process. Recent studies have shown a beneficial effect of seminal plasma in the storage of equine spermatozoa either by cooling or by cryopreservation. The objective of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of seminal plasma in the protection against oxidative stress during cryopreservation of equine spermatozoa, and to verify that effect in cell viability. In this experiment, four stallions were used and four ejaculates were obtained from each animal. After collection, seminal plasma was removed and spermatozoa resuspended in extender with seminal plasma in different concentrations 0% (T1), 5% (T2), 25% (T3) e 50% (T4). Motility, vigor, morphology, membrane, acrossome and DNA integrity, lipid peroxidation and protein oxidation were analyzed after freezing and

thawing. Seminal plasma did not affect ( $p>0,05$ ) sperm morphology and DNA integrity. Frozen spermatozoa with 5% (T2) of seminal plasma were similar ( $p>0,05$ ) to control (T1) in all variables studied, except in lipid peroxidation analysis, in which the results were higher ( $p<0,05$ ) in control in comparison with the other treatments. T4 presented lower ( $p<0,05$ ) motility, vigor, membrane and acrossome intact cells percentage. Effect of seminal plasma protection against protein oxidation was not observed ( $p>0,05$ ). In conclusion, seminal plasma presented antioxidant effect during cryopreservation, however, this effect does not protect the spermatozoa viability from other cryopreservation damages and it may even exacerbate these damages in concentrations of 25% or higher.

**Key words:** cryopreservation, equine, oxidative stress, seminal plasma, sperm viability

## 1. INTRODUÇÃO

A Inseminação Artificial (IA) é o processo de deposição do sêmen no sistema genital feminino, através de manipulação artificial, e no momento adequado, visando à fecundação do óvulo. Esta biotécnica foi a primeira a ser utilizada comercialmente nos sistemas de produção animal e trouxe um grande impacto econômico para esta área. Dentre as inúmeras vantagens da sua aplicação, pode-se citar a facilidade de comercialização e transporte de material genético e um expressivo ganho genético.

A utilização de sêmen resfriado já é comum na reprodução eqüina e sua principal vantagem é o baixo custo. Segundo Batallier et al. (2001), o sêmen de muitos garanhões sobrevive ao resfriamento a 4° C e mantém bons índices de fertilidade por 48-72 h se mantido a esta temperatura.

Entretanto, para que se possa usufruir das principais vantagens da IA, que são o melhor aproveitamento de garanhões que estejam competindo ou se recuperando de doenças e, principalmente o armazenamento de material genético, é essencial que o sêmen seja criopreservado.

Embora o sêmen criopreservado venha sendo utilizado ao longo de 50 anos na indústria bovina, sua utilização na espécie eqüina continua limitada. O grande limitante desta técnica é a baixa fertilidade obtida, quando comparado com sêmen fresco ou resfriado.

Um dos problemas na criopreservação de sêmen eqüino é a grande variabilidade individual na congelabilidade do sêmen. Esta diferença entre indivíduos parece estar relacionada a aspectos genéticos, não sendo associada à fertilidade in vivo (monta natural). No sêmen de garanhões “bons congeladores”, geralmente, a motilidade progressiva e total varia entre 40 e 70%, e pode-se obter índices de concepção de 60 a 75% por ciclo em éguas inseminadas com mais de  $300 \times 10^6$  de espermatozoides entre 24 h antes e 6 h depois da ovulação (Cristanelli et al., 1984; Haard and Haard, 1991; Jasko et al., 1992; Thomassen, 1993, Boyle, 1999). No entanto, no sêmen de garanhões “maus congeladores”, a motilidade progressiva obtida pós-congelamento pode chegar a 10-15% e refletir em

menos de 30% de índice de concepção por ciclo.

Outro grande problema relacionado ao uso de sêmen congelado é a sua reduzida vida útil no trato reprodutivo da fêmea, causada principalmente por induções de reação de acrossoma prematuras devido à retirada do plasma seminal (Morris et al., 2003) e pelos próprios processos de resfriamento e congelamento.

Durante o processo de congelamento, portanto, os espermatozóides sofrem vários danos, dentre eles pode-se destacar: alterações na membrana, capacitação prematura, alterações no DNA e o estresse oxidativo.

Tendo em vista que o plasma seminal é uma fonte de proteção natural dos espermatozóides e que no processo de criopreservação o mesmo é retirado, acredita-se que vários danos poderiam ser minimizados se este processo mantivesse uma determinada quantidade de plasma.

Existem muitas tentativas de demonstrar o efeito benéfico da adição de plasma seminal ao espermatozóide armazenado (resfriado ou congelado) na espécie eqüina (Braun et al, 1994; Aurich et al., 1996; Katila et al., 2002; Moore, 2005). No entanto, em sua maioria não avaliam o efeito direto na proteção contra o estresse oxidativo.

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na proteção contra o estresse oxidativo e seus efeitos na viabilidade espermática durante a criopreservação de sêmen eqüino mediante as avaliações in vitro de motilidade e vigor, integridade de membrana, acrossoma e DNA, peroxidação lipídica e proteínas carboniladas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Os espermatozóides**

Os espermatozóides são formados no testículo (Franca et al., 2005; De Rooij & Russel, 2000) e se tornam maduros no epidídimo (Dacheux et al., 2005; Dacheux & Dacheux, 2002). Após a ejaculação, devem atingir o istmo do oviduto, onde ocorre a fecundação (Rodriguez-Martinez et al., 2005; Blandau, 1973; Hunter, 1996). Neste local, os espermatozóides que foram capacitados, se ligam à zona pelúcida do ovócito (Rath et al., 2005). Segundo Flesch & Gadella (2000), essa ligação induz a reação acrossômica e os hiper-ativos penetram na zona pelúcida. Finalmente, as células espermáticas se ligam e fusionam com o oolema (Evans & Florman, 2002). De acordo com Silva & Gadella (2006), após fecundação, o DNA do espermatozóide se descondensa, o pró-núcleo masculino se forma e se liga ao pró-núcleo feminino e dá origem ao genoma diplóide do novo indivíduo. Portanto, para a obtenção de sucesso na concepção, os espermatozóides devem possuir membrana e organelas íntegras e funcionais e um genoma haplóide intacto. Em técnicas de reprodução assistida, como a IA e fertilização in vitro (FIV) os espermatozóides não são introduzidos diretamente no trato genital da fêmea durante ejaculação, mas são primeiramente coletados em recipientes através de vagina artificial ou eletroejaculação. Os espermatozóides coletados são lavados, diluídos e resfriados ou congelados por determinados períodos até serem depositados no trato reprodutivo de fêmea, como no caso da IA. Vários passos durante o processamento do sêmen podem ser responsáveis por danos no DNA, na membrana e organelas. Para que se possa obter bons índices de concepção é necessário que se conheça a sua estrutura e os danos causados durante o seu processamento a fim de se minimizar ou eliminar tais danos.

#### **2.1.1. Membrana plasmática**

A membrana plasmática dos espermatozóides envolve toda a célula,



mantendo todos seus componentes intracelulares e organelas juntos e, através de suas características semi-permeáveis, mantém um gradiente químico adequado de íons e outros componentes solúveis. Para Ladha (1998), a membrana plasmática consiste de cinco domínios específicos: acrossoma, segmento equatorial, segmento basal, região intermediária e cauda. Diferenças entre estas regiões estão relacionadas às suas diferentes funções fisiológicas.

As membranas celulares são compostas de três classes de moléculas: lipídios, proteínas e carboidratos. Os lipídios são responsáveis pela integridade estrutural, as proteínas são as principais responsáveis pela ocorrência da maioria dos processos dinâmicos e os carboidratos desempenham importante papel nas interações entre as células.

Mann & Lutwak-Mann (1981) relatam que, apesar de existir uma considerável variação entre espécies, a membrana plasmática dos espermatozoides é composta de aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios. Segundo Alberts et al. (1989), os fosfolipídios mais encontrados são fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e esfingomielina.

Uma grande variação na composição de lipídios neutros pode ser observada entre espécies, entre animais da mesma espécie e entre ejaculados do mesmo animal. De acordo com Flesch & Gadella (2000) o fator que mais varia é a quantidade de colesterol. Em comparação a outras espécies, como a bovina, a membrana plasmática dos espermatozoides eqüinos possui uma quantidade de colesterol relativamente alta, em torno de 37%. Para Yanagimachi (1994), as diferenças na quantidade de colesterol na membrana plasmática podem não estar apenas relacionadas com índices de capacitação, mas também podem afetar a fertilidade e a capacidade do ejaculado de um garanhão a suportar o resfriamento e congelamento. Segundo Minelli et al. (1998), em garanhões, o plasma seminal pode bloquear o efluxo de colesterol da membrana plasmática através de vesículas ricas em colesterol originadas da próstata (prostasomos).

A fluidez da membrana depende da temperatura, de seu conteúdo de colesterol, e de sua composição lipídica, sendo que o comprimento e o grau de instauração das cadeias de ácido graxos (AG) exercem importante papel. A

presença de ácidos graxos saturados favorece o estado rígido, pois suas caudas hidrocarbonadas retas interagem muito favoravelmente umas com as outras. Por outro lado, Alberts et al. (1989) relataram que uma dupla ligação produz uma dobra na cauda, dificultando o estabelecimento de uma maior organização entre as cadeias de AG. Já a insaturação e o menor comprimento das cadeias lipídicas, de acordo com Darnell et al. (1990), aumentam a fluidez dos AG e, geralmente, lipídios com essas características passam pela fase de transição a temperaturas menores que aqueles com cadeias longas ou saturadas. A fase de transição é a reorganização das cadeias hidrocarbonadas que, estando em um estado mais fluido ou desordenado, passam por uma organização acentuada, estado similar ao gel (Stryer, 1992), e tal fase ocorre em função de mudanças na temperatura. Segundo Amman & Graham (1993), para a célula espermática eqüina, a fase de transição ocorre a uma temperatura de 20,7°C.

Quanto ao comportamento das membranas frente a congelação, segundo Alberts et al. (1989), aquelas em que predominam lipídios de cadeia curta e com maior número de insaturação, são menos resistentes, em razão da menor tendência das caudas hidrocarbonadas interagirem e as duplas ligações dificultarem o seu agrupamento.

Uma maior quantidade de ácidos graxos insaturados também torna os espermatozóides mais suscetíveis ao estresse oxidativo. Uma cascata de peroxidação lipídica ocorre quando espécies reativas de oxigênio (ROS) em excesso, reagem com ácidos graxos insaturados presentes na membrana espermática (Storey, 1997; Jones et al., 1979). De acordo com Storey (1997), como conseqüência desta peroxidação, a membrana perde fluidez e integridade necessárias para fertilização.

Quanto ao conteúdo protéico, Zúccari (1998) relata que os espermatozóides do garanhão possuem um teor de 50%. As proteínas são classificadas em integrantes (destacadas da membrana unicamente por solventes detergentes) ou periféricas (solúveis em diluidores de sêmen ou água, de fácil remoção). As integrantes interagem amplamente com as cadeias hidrocarbonadas de lipídios, mantendo as mesmas ancoradas e, portanto, só podem ser liberadas por agentes

que competem com essas interações não-polares. Já as periféricas, em grande maioria, estão ligadas à superfície das proteínas integrantes no lado citosólico ou extracelular. Podem também se ligar por interação direta com as cabeças polares dos lipídios, mas não interagem com a porção hidrofóbica da bicamada de fosfolipídios. Segundo Darnell et al. (1990), soluções com alta força iônica rompem ligações iônicas fracas que agem entre as proteínas, removendo-as da superfície.

De acordo com Zúccari (1998), os carboidratos estão presentes em torno de 2 a 10% do peso total da membrana. Darnell et al. (1990) relatam que essas moléculas estão ligadas às proteínas dando origem às glicoproteínas ou aos lipídios, constituindo os glicolipídios, e dessa forma aumentam o caráter hidrofílico e estabilização da estrutura da membrana. Segundo Stryer (1992), os grupamentos glicídicos estão situados sempre no lado extracelular e no caso das glicoproteínas geram uma barreira para difusão transversal, auxiliando na manutenção do caráter assimétrico da membrana além de serem importantes também no reconhecimento intercelular. Amman & Graham (1993) relatam que nos espermatozoides eqüinos, os glicolipídios constituem menos de 10% dos lipídios polares presentes e sua agregação em microdomínios, na fase gel, obriga as proteínas do glicocálix a se agregarem na porção fluida restante, o que pode alterar a função dos seus componentes

### **2.1.2. Capacitação**

Após ejaculação, os espermatozoides sofrem uma série de mudanças em sua arquitetura e metabolismo antes de adquirirem capacidade para se ligar à zona pelúcida e fecundar o ovócito; essas mudanças são conhecidas como capacitação e, em um processo de monta natural, ocorrem no trato reprodutivo da fêmea. Neild et al. (2005) relatam que estas mudanças incluem os sinais para a entrada de cálcio na célula, aumento de cálcio intracelular e níveis de AMPc, aumento na fluidez como resultado de alterações na composição e arquitetura lipídica e mudanças na atividade metabólica gerando uma hipermotilidade. Uma parte importante da capacitação no trato reprodutivo da fêmea é a remoção gradual ou alteração na

estrutura de componentes da superfície espermática, especialmente na região acrossômica, que resultam na exposição de receptores que permitem que o espermatozóide reconheça, se ligue à zona pelúcida e sofra reação acrossômica, um evento que permite a penetração do espermatozóide e sua posterior fusão com o oolema. A capacitação é, portanto, um evento essencial na fecundação. Segundo Watson (1995), uma vez capacitados, os espermatozóides têm uma longevidade reduzida.

Atualmente, muitos pesquisadores têm relatado mudanças nos espermatozóides criopreservados semelhantes às que ocorrem durante a capacitação (Bedford et al., 2000; Green & Watson, 2001; Schembri et al., 2002; Cormier & Bailey, 2003; Neild et al., 2003), e, por isso, a denominam “criocapacitação”. Para Ellington et al. (1999), esta capacitação que ocorre durante a criopreservação é de grande interesse no estudo desta técnica, já que estas alterações que os espermatozóides sofrem podem reduzir a longevidade da célula espermática criopreservada. A reduzida longevidade dos espermatozóides no trato reprodutivo da fêmea é extremamente importante na espécie eqüina, que possui um estro relativamente longo e, portanto, requer maior controle do momento da inseminação.

### **2.1.3. Reação Acrossômica**

A reação acrossômica (RA), é um evento irreversível que, sob condições fisiológicas, é induzida pela ligação do espermatozóide com a zona pelúcida e só ocorre após capacitação. Durante a RA, a membrana plasmática se funde com a membrana acrossomal externa em vários locais da porção anterior da cabeça do espermatozóide. Isto resulta em liberação do conteúdo do acrossoma (na maior parte, enzimas) que promovem interação, e subsequente digestão e penetração na zona pelúcida. Para Yanagimachi (1994), uma importante consequência da RA é a aquisição de fusogenicidade pelo segmento equatorial da membrana plasmática, que é necessário para a ligação e fusão com oolema.

Em um estudo realizado por Schembri et al. (2002) utilizando a técnica de

fluorescência de clortetraciclina (CTC), foi demonstrado que ejaculados frescos de garanhões apresentavam a maioria dos espermatozóides não-capacitados (93,6%) e baixa percentagem de capacitados (5,4%) e acrossoma-reagidos (1%). Entretanto, após criopreservação em meio de Kenney modificado (meio descrito por Kenney et al., 1975, sem bicarbonato de sódio e sulfato de gentamicina), observou-se um aumento na proporção de espermatozóides capacitados (64,8%;  $p < 0.001$ ) e acrossoma-reagidos (32,8%;  $p < 0.001$ ) e uma redução na proporção de espermatozóides não-capacitados (2,5%;  $p < 0.001$ ). A técnica de coloração consistia da adição de sêmen em solução de clortetraciclina e observação de preparação úmida em microscópio de epifluorescência. As categorias observadas eram: não-capacitados (fluorescência moderada e uniforme por toda a cabeça do espermatozóide com uma linha de fluorescência mais clara sobre o segmento equatorial), capacitados com acrossoma intacto (maior fluorescência sobre o acrossoma) e células com acrossoma reagido (não apresentando fluorescência). No mesmo trabalho, observou-se que uma maior diminuição na proporção de espermatozóides não-capacitados e maior aumento de capacitados ocorreu após centrifugação e remoção do plasma seminal e ressuspensão em meio de congelamento. Centrifugação e ressuspensão com plasma seminal homólogo não induziu capacitação. Portanto, este trabalho demonstrou que processo de congelamento promove alterações relacionadas com capacitação e que a maior parte dessas mudanças se devem à remoção do plasma seminal.

#### **2.1.4. Integridade do DNA**

A cromatina espermática é uma estrutura altamente organizada, compacta que consiste de DNA e nucleoproteínas heterogêneas. A natureza compacta e insolúvel da mesma protege a integridade do genoma durante a passagem pelo trato reprodutivo do macho e da fêmea.

Estresses fisiológicos e ambientais, assim como mutações e anormalidades acrossômicas podem perturbar os eventos bioquímicos que ocorrem durante a espermatogênese. Segundo Evenson et al. (2002), estas alterações podem levar a

anormalidades na cromatina, que são incompatíveis com a fertilidade.

A integridade do DNA é de vital importância para o desenvolvimento do embrião. Para Seli et al. (2004), o grau de danos no DNA está claramente correlacionado com a diminuição da capacidade de desenvolvimento do embrião e danos severos no mesmo causam infertilidade no macho. Por outro lado, experimentos realizados por Silva & Gadella (2006) utilizando a fecundação in vitro (FIV) com espermatozoides irradiados com raios gama demonstraram que os mesmos, com severos danos no DNA, permanecem funcionais ao nível de membrana e organelas e motilidade. De fato, espermatozoides com DNA danificados apresentaram características normais de ligação com a zona pelúcida e também índices normais de fecundação e clivagem. No entanto, observou-se apoptose em torno do quarto ao oitavo estágio de clivagem embrionária (Bordignon & Smith, 1999; Ahmadi & Ng, 1999; Fatehi et al., 2006). Segundo Silva & Gadella (2006), falhas reprodutivas, causadas por aberrações no DNA, parecem não afetar no momento de fecundação, mas no momento de expressão do DNA embrionário.

Em um estudo realizado por Baumber et al. (2003), a criopreservação demonstrou ser prejudicial à integridade do DNA. A criopreservação de espermatozoides eqüinos foi associada com um aumento na fragmentação do DNA quando comparado com sêmen fresco. Um dos motivos pode estar relacionado com a retirada do plasma seminal, que confere proteção aos espermatozoides contra estresse oxidativo. Muitos estudos têm relacionado danos no DNA de espermatozoides humanos com peroxidação lipídica (Chen et al, 1997; Twigg et al., 1998, Potts et al., 2000) e estresse oxidativo (Hugues et al., 1996; Aitken et al, 1998a, Twigg et al, 1998; Donnelly et al, 1999).

## **2.2. A Criopreservação**

A criopreservação constitui-se das etapas de diluição, centrifugação, resfriamento, congelamento e descongelamento do sêmen. Os danos que os espermatozoides sofrem durante este processo podem ser ultra-estruturais ou físicos, bioquímicos ou funcionais.

O processo de criopreservação possui várias etapas que podem danificar os espermatozóides, tais como: a mudança de temperatura, o estresse osmótico e tóxico causado pela exposição aos crioprotetores, e a formação e dissolução de gelo no ambiente extracelular.

A água pura se congela e forma cristais de gelo a 0°C. Já o ponto de congelação de uma solução é determinado pela concentração de partículas que ela contém como soluto. Segundo Zúccari (1998), à medida que a água pura de uma solução se congela, ocorre um aumento de concentração de solutos no líquido residual e isto resulta em uma queda contínua do ponto de congelação da solução. Para Pickett (1986), a lesão celular é causada pela formação de cristais de gelo intracelular que afetam a estrutura da célula, pela concentração de soluto resultante da congelação da água pura e da interação entre estes dois fatores.

O primeiro estresse térmico pelo qual as células espermáticas passam durante o processo de congelação ocorre durante o resfriamento de 37°C a 5°C. se o resfriamento é feito de modo inadequado, os espermatozóides sofrem o choque térmico, que induz a danos parcialmente irreversíveis caracterizados por um padrão anormal de motilidade (movimento circular ou retrógrado), rápida queda de motilidade, dano acrossomal, dano na membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda de componentes intracelulares. Segundo Graham (1996), para o espermatozóide equino, esses efeitos podem ser minimizados pelo controle da taxa de resfriamento entre temperaturas críticas, de 19°C e 8°C e pela adição de lipídios (gema de ovo) ou lipoproteínas (leite) ao diluidor.

Zúccari (1998) relata que o ponto de congelação do citoplasma celular está, normalmente, abaixo de -1°C, mas as células geralmente permanecem não congeladas na faixa entre -10°C a -15°C, isto é, se encontram super-resfriadas, mesmo quando o gelo está presente. Tal fato indica que a membrana plasmática pode prevenir a propagação do gelo extracelular para o interior da célula super-resfriada. Considerando-se que a pressão de vapor da água super-resfriada é maior que a do gelo, as células começam a se equilibrar através da desidratação e ocorre uma concentração de eletrólitos no interior da célula. À medida que a solubilidade dos eletrólitos vai sendo ultrapassada, os solutos se precipitam, alterando o pH e,

abaixo do ponto eutético do sistema, temperatura na qual não resta nenhum líquido, ocorre a precipitação de todos os solutos. Mazur (1970) denominou estes eventos de efeito de solução. Para Pickett (1986), o aumento de concentração de soluto induz a uma desnaturação protéica e, como consequência, reduz a atividade enzimática de espermatozóides congelados.

Segundo Zúccari (1998), existe uma dificuldade em se compreender o efeito de solução devido ao fato de pelo menos quatro fatores distintos estarem envolvidos durante o processo de congelação. São eles: 1) a água pura é removida em forma de gelo; 2) ocorre a concentração de solutos de alto e baixo peso molecular; 3) há a redução do volume celular e 4) os solutos se precipitam. Todos estes fatores têm sido estudados para explicar as lesões celulares, mas com exceção da precipitação de solutos, os demais dependem da temperatura e ocorrem simultaneamente durante a congelação.

Abaixo de  $-20^{\circ}\text{C}$ , os espermatozóides começam a apresentar mudanças biofísicas, principalmente na membrana plasmática e, abaixo de  $-60^{\circ}\text{C}$ , sofrem efeitos de descompensação iônica e de lipídios, suficientemente graves para causar choque térmico. Angola (1994) relata que o efeito deste choque resulta em alteração da motilidade (movimentos em círculos ou retrógrado, presença de peças intermediárias dobradas) e muitos desses processos são considerados irreversíveis.

A regulação de cálcio também é afetada pelo resfriamento, o que provoca sérios efeitos sobre a função celular. Para Watson (2000), o efluxo do cálcio resulta na capacitação e fusão entre membrana plasmática e a porção interna da membrana acrossomal externa, o que seria um processo desorganizado da reação acrossomal.

Segundo Gao et al. (1993), a adição e remoção de crioprotetores implicam em estresse osmótico na membrana plasmática dos espermatozóides, dependendo da relativa permeabilidade dos crioprotetores. Além disso, Santos (2003) destaca que os espermatozóides são altamente sensíveis a efeitos tóxicos dos crioprotetores, que dependem principalmente da concentração utilizada e do período de exposição das células a esses agentes. Os crioprotetores podem ser divididos em dois grupos: os permeantes, que atravessam a membrana plasmática



do espermatozóide e atuam no meio intracelular e extracelular. Neste grupo estão as pequenas moléculas como o etilenoglicol, glicerol, propilenoglicol, dimetilsulfóxido, acetamida e outras amidas; os não-permeantes, que são grandes moléculas que não atravessam a membrana plasmática e podem ser proteínas como as presentes no leite e gema do ovo, açúcares e polímeros sintéticos (Pickett & Amann, 1993; Mckinnon, 1996; Leibo & Bradley, 1999). Para Watson (1995), os crioprotetores permeantes atuam por meio de suas propriedades coligativas, e diminuem o ponto crioscópico intracelular, de maneira que uma quantidade maior de água vai permanecer no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos, propiciando um ambiente menos deletério à célula espermática durante o congelamento. De acordo com Dalimata & Graham (1997), os não-permeantes protegem as células por meio de efeitos osmóticos, criando um meio hipertônico que induz a saída de água do meio intracelular para o extracelular, causando a desidratação do espermatozóide e posterior redução da formação de cristais intracelulares durante o congelamento. Estudos recentes têm demonstrado bons resultados ao serem utilizadas amidas, tais como acetamida, metil-formamida e dimetil-formamida como crioprotetores no congelamento de sêmen de eqüinos (Vidament et al., 2002; Gomes et al, 2002; Medeiros et al., 2002). Quando comparado com glicerol, o efeito de concentrações crescentes de dimetil-formamida foi tão eficiente quanto o glicerol (2% e 3%) em manter a motilidade e capacidade de fertilização, segundo estudos realizados por Vidament et al. (2002).

Em adição aos fatores que influenciam a sobrevivência dos espermatozóides, Ball & Vo (2001) relataram que danos "subletais" são importantes limitações para eqüinos e suínos. Estudos demonstram que espermatozóides submetidos a baixas temperaturas sofrem capacitação prematura, danos osmóticos, danos oxidativos nos fosfolipídios de membrana e cromatina, e danos no DNA.

Estudos anteriores relataram que a habilidade de capacitação e de exocitose acrossômica dos espermatozóides eqüinos estão associados com o armazenamento a 4°C, e com o tipo de diluente (Ball & Vo, 2001). Linfor & Meyres (2002) também demonstraram que sêmen resfriado, diluído e, também, descongelado sem proteção apresentaram danos na fragmentação do DNA.

### 2. 3. Estresse oxidativo

Para Aitken & Fisher (1994), espécies reativas de oxigênio (ROS – reactive oxygen species) são agentes altamente reativos pertencentes à classe de radicais livres. Warren et al. (1987) definem radical livre como “qualquer átomo ou molécula que possui um ou mais elétrons não pareados”. Apesar de sua produção controlada ser extremamente importante em funções fisiológicas de vários tipos diferentes de células, o desequilíbrio na sua produção ou a diminuição da capacidade antioxidante da célula pode ser deletério para a mesma.

Apesar do estresse oxidativo ter sido relatado como fator importante na indução da função espermática há mais de 50 anos (MacLeod, 1943), somente nos últimos 10 a 15 anos é que tem ganhado maior importância. Estudos recentes indicam que ROS participam de um importante papel na função espermática e que sua produção desequilibrada ou sua degradação podem causar efeitos adversos nos espermatozoides (Aitken, 1995; De Lamirande & Gagnon, 1999). Portanto, estes possuem tanto efeitos benéficos, a baixas concentrações e efeitos deletérios, a altas concentrações, dependendo do equilíbrio relativo entre sua produção e sua degradação.

A geração controlada de ROS em pequenas quantidades parece ter um papel importante em sinais de transdução de eventos durante a capacitação, hiperativação, e exocitose acrossômica (De Lamirande & Gagnon, 1999; De Lamirande & Gagnon, 1995a; Aitken et al, 1998b). Acredita-se que a geração de ambos  $O_2$  e  $H_2O_2$  estimulam a capacitação espermática através da elevação do AMPc, ativação da proteína Kinase A e indução da fosforilação da tirosina (De Lamirande & Gagnon, 1999; Aitken et al, 1998b).

O estresse oxidativo no sêmen ocorre como resultado de um desequilíbrio entre produção de ROS e sua capacidade antioxidante. Os espermatozoides são bastante suscetíveis a estresse oxidativo devido à grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes na sua membrana (Alvarez & Storey, 1992) e por seu citoplasma conter baixa concentração de enzimas antioxidantes (de Lamirande & Gagnon, 1995b; Sharma & Agarwal, 1996). Além disso, Iwasaki & Gagnon (1992)

relatam que as enzimas intracelulares não podem proteger a membrana plasmática que envolve o acrossoma e a cauda, tornando a proteção bastante dependente do plasma seminal

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a geração de ROS pelos espermatozóides, que podem ser produzidas durante o metabolismo oxidativo, e o aumento de sua concentração pode ser devido à presença de espermatozóides anormais ou danificados. Ball et al (2001) demonstraram que há um aumento de cinco vezes na produção de ROS após congelamento na espécie eqüina. Da mesma forma, a criopreservação de espermatozóides bovinos foi associada a um aumento significativo na produção de ROS por Chatterjee & Gagnon (2001). Fisiologicamente, existem evidências de que os espermatozóides possuem mecanismos específicos de geração de ROS por via NADPH oxidase dependente (Aitken, 1995; Ball et al, 2001; Banfi et al, 2001; Aitken et al, 1997). O ânion superóxido é produzido rapidamente e transformado em peróxido de hidrogênio (Aitken, 1995), que é a espécie reativa de oxigênio responsável por danos oxidativos em espermatozóides humanos (Aitken et al, 1993a; Griveau et al, 1995) e eqüinos (Baumber et al., 2000).

A produção desequilibrada de ROS resulta em peroxidação de grande quantidade de lipídeos de membrana insaturados, diminui motilidade espermática, inicia a fusão ovócito-espermatozóide e causa danos no DNA (Aitken, 1995; Aitken et al, 1998ab; De Lamirande & Gagnon, 1999). Segundo Flesch & Gadella (2000), a alteração em lipídeos de membrana pode, ao mesmo tempo, levar a uma perda de fluidez e alteração da permeabilidade. Juntamente com os efeitos causados na membrana plasmática e na motilidade espermática, Aitken et al. (1998a) citam o dano no DNA do espermatozóide como outro fator importante causado pelo estresse oxidativo. Para eles, a fragmentação de DNA subsequente a um estresse oxidativo ocorre antes da diminuição de capacidade de fecundação dos mesmos nos espermatozóides humanos. De acordo com Donnelly et al (2001), o aumento da fragmentação do DNA está associado a criopreservação, e tal dano pode ser reduzido pela adição de plasma seminal. Tais dados sugerem que danos oxidativos ao DNA dos espermatozóides devem ocorrer naqueles que são capazes de chegar

à fecundação e que os danos no DNA podem ser componentes críticos de danos oxidativos a estas células. Van Der Schans et al. (2000) constataram que danos oxidativos no DNA dos espermatozóides bovinos criopreservados tiveram uma alta correlação negativa com índices de não retorno. Estudos recentes realizados por Baumber et al. (2003) demonstraram que ROS e a criopreservação podem induzir a uma fragmentação de DNA nos espermatozóides eqüinos e acredita-se que estes danos oxidativos são importantes características da redução da fertilidade após a criopreservação.

Segundo Stadtman (1986), a proteína é outro tipo de molécula biológica que pode ser altamente danificada por ROS. Proteínas modificadas por estresse oxidativo têm sido relacionadas com uma variedade de processos fisiológicos e patológicos no organismo. Estudos realizados por Ciolino & Levine (1997) demonstraram que as proteínas são possivelmente oxidadas antes da diminuição de ATP celular e sua subsequente morte. O acúmulo de proteínas modificadas por estresse oxidativo causa alterações nas funções celulares através da perda da integridade estrutural e catalítica ou por interrupção de mecanismos regulatórios. No entanto, seus efeitos nos espermatozóides continuam desconhecidos e precisam ser estudados.

Existem evidências substanciais de que a criopreservação também promove a capacitação espermática (Watson, 2000; Bailey et al, 2000), e esta criocapacitação é freqüentemente citada como fator associado à redução da longevidade do espermatozóide criopreservado no trato reprodutivo da fêmea (Bailey et al, 2000). A indução de criocapacitação tem sido atribuída a um aumento intracelular de cálcio associado com danos de membrana (Bailey & Buhr, 1994) assim como aos efeitos do aumento de ROS (Bailey et al, 2000). Para Morris et al. (2000), mudanças relacionadas com a capacitação também ocorrem em espermatozóides eqüinos.

Catalase, superóxido dismutase (SOD) e sistema glutadiona peroxidase/reductase e (GPx/ GRD) são as principais enzimas com ação antioxidante presentes no sêmen. De acordo com Ball et al (2000), o sêmen eqüino possui uma atividade de catalase e a maior parte desta atividade se deve ao plasma seminal. Portanto,

parecem existir altos níveis de ambos SOD e GPx em plasma seminal eqüino. A alta concentração de enzimas antioxidantes no sêmen é igualmente importante para a prevenção de danos aos espermatozóides e para prevenir a capacitação prematura secundariamente à geração de ROS. A remoção do plasma seminal durante um processo de criopreservação, portanto, diminui a capacidade de ação contra os efeitos de ROS devido ao limitado volume citoplasmático, além da remover enzimas antioxidantes presentes no plasma. Vários estudos demonstraram uma redução significativa na capacidade antioxidante do sêmen com a criopreservação. A mesma reduziu SOD em espermatozóides humanos (Lasso et al, 1994) e bovinos (Bilodeau et al, 2000) e níveis de glutadiona (GSH) também diminuíram durante a criopreservação de espermatozóide bovino (Bilodeau et al, 2000). As enzimas SOD foram correlacionadas com a motilidade após a criopreservação de espermatozóides humanos (Alvarez & Storey, 1992) e eqüinos (Ducci et al, 1999) confirmando diminuição das mesmas após processo de congelação.

Pesquisas revelam que testes que avaliam estresse oxidativo no sêmen, possuem a capacidade de diagnosticar e prognosticar qualidade e funções espermáticas acima dos testes convencionais em clínicas humanas. Para Saleh & Agarwal (2002), um teste de avaliação de estresse oxidativo em sêmen de humanos, pode determinar diferenças entre pacientes férteis e inférteis e identificar aqueles com diagnóstico de infertilidade cujo estresse oxidativo seja um fator determinante.

#### **2. 4. Plasma Seminal**

O plasma seminal consiste em um fluido produzido pela rete testis, epidídimo, e glândulas acessórias. De acordo com Edwards et al. (1981), o mesmo contém vários componentes de extrema importância para o funcionamento e sobrevivência dos espermatozóides Sua função, segundo Miller et al. (1990), é servir como um veículo para os espermatozóides ejaculados, diluindo e/ou fornecendo substratos metabolizáveis para a célula espermática.

Os espermatozóides e o plasma seminal possuem substâncias enzimáticas e não-enzimáticas que servem como mecanismo de defesa contra ROS. Além dessas enzimas, o plasma seminal contém outros componentes que agem como antioxidantes, entre eles, a vitamina E, vitamina C, urato, albumina, taurina e hipotaurina (Baumber et al, 2000; Almeida & Ball, 2005).

Guerra et al. (2004) relatam que a proteção contra alta produção de ROS e a prevenção de danos celulares através da ação antioxidante do plasma seminal é importante para o potencial reprodutivo, uma vez que evidências têm sugerido que a baixa capacidade antioxidante total encontrada no sêmen está correlacionada à infertilidade.

Apesar de sua reconhecida importância, muitos procedimentos de criopreservação e resfriamento preconizam a retirada do plasma seminal, substituindo-o por diluentes, reduzindo assim a proteção conferida aos espermatozóides. Amann & Pickett (1987) relatam que a sua remoção é necessária para a sobrevivência dos espermatozóides criopreservados. No entanto, existem poucos trabalhos indicando que a sua remoção possa ser, de fato, benéfica ao mesmo. Além disso, alguns trabalhos indicam que o plasma seminal é benéfico ao espermatozóide humano (Ben et al., 1997) e eqüino (Aurich et al., 1996; Katila et al., 2002) criopreservado. Em estudos realizados por Ben et al. (1997), altas percentagens de espermatozóides móveis foram obtidas de espermatozóides humanos criopreservados em diluentes contendo plasma seminal em volumes de 50% e 75% do volume inicial comparados com 5% e 25% do mesmo. Da mesma forma, Katila et al. (2002) obtiveram maiores percentagens de espermatozóides móveis de garanhões, após criopreservação, com 20% de plasma seminal do volume original comparado com o controle, onde todo o plasma foi removido. Além disso, Aurich et al. (1996) relataram que espermatozóides de garanhões que apresentavam baixa motilidade pós-descongelamento (<20%) apresentaram maior motilidade quando foram criopreservados com plasma seminal de garanhões que produziam espermatozóides com alta motilidade após descongelamento. Portanto, o plasma seminal deve conter componentes que protegem a membrana dos espermatozóides durante a criopreservação. O mesmo deve variar entre garanhões

e conter diferentes quantidades dos componentes que devem ser fatores determinantes da sua capacidade de sobreviver a criopreservação.

Em estudos realizados por Pickett et al (1975), foi demonstrado que uma alta concentração de plasma seminal em sêmen diluído foi deletério para sêmen eqüino e bovino resfriado. Já Braun et al, em 1994, demonstraram que a motilidade espermática do sêmen de garanhões durante o armazenamento por resfriamento foi melhor em espermatozoides mantidos com 25% de plasma seminal, quando comparado com ausência de plasma.

Segundo Watson (1995), a criopreservação induz mudanças na membrana plasmática que fazem os espermatozoides se comportarem como se estivessem parcialmente capacitados. Esta capacitação prematura pode ser resultado da perda de lipídios durante o congelamento e descongelamento (Watson, 1995) e/ou da perda de fatores descapacitantes que são removidos, juntamente com o plasma após a centrifugação. Quando os espermatozoides (tanto capacitados como não-capacitados) são expostos ao plasma seminal, eles ficam incapacitados de sofrer reação acrossômica precoce e completar a fertilização (Begley & Quinn, 1982; Mortimer et al., 1998). Para Moore et al. (2005), a adição do plasma seminal, portanto, previne a capacitação prematura e pode transformar espermatozoides capacitados em sua forma não-capacitada, o que pode aumentar a longevidade dos mesmos.

## **2.5. Avaliações “in vitro” do sêmen criopreservado**

Embora a avaliação do sêmen criopreservado mediante taxas de concepção de éguas submetidas à IA seja o método mais adequado e eficiente para a avaliação do potencial da fecundação do sêmen, esta análise in vivo requer um grande número de animais e depende de vários fatores, tais como volume inseminante e número de doses, local para deposição do sêmen, sincronização de cio de éguas para inseminar no momento ideal, e os fatores inerentes à fêmea (Fonseca et al., 1992; England, 1993; Fastard, 1996), o que a torna quase que inviável para avaliação de rotina. Além disso, este método não considera

alterações específicas que o espermatozóide possa sofrer e que serão o foco deste trabalho.

Várias técnicas para avaliação de sêmen podem ser utilizadas para determinar características biológicas e estruturais relacionadas com o potencial fecundante do sêmen congelado.

Deve-se considerar que quanto maior o número de características avaliadas, mais exata será a estimativa de fertilidade.

### **2.5.1. Motilidade e vigor**

A motilidade e o vigor são testes rotineiramente utilizados para avaliar viabilidade dos espermatozóides. Para sêmen congelado, é recomendável uma motilidade progressiva mínima pós-descongelção de 30%, para a obtenção de taxas de prenhez satisfatórias (Volkman & van Zyl, 1987), embora haja grandes diferenças entre valores de motilidade pós-descongelção e taxas de prenhez (Pickett et al., 1987).

De acordo com Heitland et al. (1996), muitos fatores podem afetar a motilidade do sêmen congelado como a concentração de espermatozóides/ml, a composição da diluidor, o tempo de centrifugação, a taxa de resfriamento e o volume da palheta.

Embora sejam avaliações de rápida execução, baixo custo e de alta aplicabilidade em nível de campo, deve-se destacar que não consistem de métodos ideais, pois consideram apenas duas características das células espermáticas, além de estarem sujeitas à influência de fatores como temperatura da amostra, volume da gota, tempo de preparo da lâmina e diferentes critérios de avaliação entre examinadores.

Essa avaliação também pode ser realizada pelo método CASA (Análise Espermática Assistida por Computador), que possui elevados níveis de precisão, e tem sido utilizado para avaliar a motilidade de sêmen de humanos, touros, garanhões, cães e animais de laboratório (Verstegen et al., 2002). Este método proporciona informações precisas e exatas sobre as características de movimento



do sêmen. No entanto, o alto custo do equipamento e a necessidade de maior padronização das características de cada espécie tornam este método pouco viável.

### **2.5.2. Morfologia espermática**

Os defeitos de morfologia dos espermatozoides podem ser divididos em maiores ou menores. Segundo Rao (1971), os defeitos maiores estão associados com diminuição do potencial fecundante, enquanto que os defeitos menores possuem pouco efeito na fecundação e podem ser compensados através da adição de um maior volume de sêmen. É pouco provável que a criopreservação possa induzir alterações na morfologia espermática. No entanto, uma inadequada manipulação do sêmen ou submissão das partidas a temperaturas inadequadas de armazenamento podem induzir alterações irreversíveis como danos de acrossoma ou cauda.

Para realização de tal avaliação, podem ser utilizados esfregaços corados ou preparação úmida. De acordo com o CBRA (1998), colorações específicas para determinadas partes do espermatozoide podem melhorar a acuidade do exame.

### **2.5.3. Integridade de Membrana**

Várias técnicas podem avaliar o estado em que se encontra a membrana espermática. O desenvolvimento de métodos de coloração com corantes supra-vitais e fluorescentes aumentaram as possibilidades de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides. No entanto, os corantes supra-vitais não são indicados para avaliação de amostras de sêmen congelado, pois a presença de crioprotetor interfere no processo de coloração. Já os fluorocromos vêm sendo empregados isoladamente ou em combinação, sendo de grande valor para a determinação da integridade da membrana.

Os corantes fluorescentes com afinidade para DNA, não são permeáveis às células intactas e, portanto, coram apenas células mortas. Zúccari (1998) relata que o brometo de etídeo, iodeto de propídio e hidroetidina, entre outros, fazem parte

deste grupo. Rotman & Papermaster (1966), em estudo com corantes fluorescentes, observaram que os ésteres de fluoresceína, por serem compostos não-polares, penetravam prontamente na célula, eram hidrolisados por esterases, produzindo fluoresceína. A mesma, sendo um composto polar, não saía da célula com a mesma velocidade com que seus ésteres ingressavam, conseqüentemente, causava acúmulo intracelular. Tais autores também verificaram um aumento linear de acúmulo no interior da célula até em torno de 50 minutos. A faixa de pH máxima em que a reação ocorria era de 6,7 a 8,0. Para a temperatura, constataram que os substratos eram inativados a 50°C. Além disso, verificaram que o acúmulo desses fluorocromos nas células não era deletério, pois as mesmas apresentavam crescimento normal.

Esta técnica era utilizada, a princípio, para leitura em citometria de fluxo, pois espermatozóides permaneciam móveis durante avaliação (Garner et al., 1986). Na técnica descrita por Harrison & Vickers (1990), acrescentou-se o formaldeído para a paralisação das células sem causar danos estruturais nas mesmas e, a partir daí, tornou-se possível a avaliação de preparações úmidas sob microscopia de epifluorescência. Esta técnica é uma alternativa viável, já que o equipamento de citometria de fluxo é de custo extremamente elevado.

Além da associação de fluorocromos, um outro método bastante utilizado para avaliar integridade de membrana, principalmente em humanos, é o teste hiposmótico (Drevius, 1972; Lomeo & Giambersio, 1991; Jeyendran et al., 1992; Hideki et al., 1993). Este teste consiste da observação do comportamento dos espermatozóides quando submetidos a um meio hiposmótico. Ocorre um influxo de água através da membrana para manter o equilíbrio no meio intracelular e extracelular. Como conseqüência, ocorre um edema, principalmente na região da cauda. Ao sofrer o choque osmótico, o espermatozóide tende a dobrar a cauda, indicando integridade estrutural e funcional da membrana (Jeyendran et al., 1984). Em um estudo realizado por Dell'aqua et al. (2002), cento e oito amostras de sêmen congelado de diferentes ganhões foram analisadas e observou-se uma correlação positiva e significativa entre o teste hiposmótico, a avaliação de motilidade espermática computadorizada e o teste de integridade de membrana através de

sondas fluorescentes. Apesar do teste hiposmótico ser um método de fácil preparação e bastante empregado atualmente, ainda apresenta variações entre as metodologias descritas.

#### **2.5.4. Integridade de acrossoma**

Várias técnicas de microscopia têm sido descritas para avaliar a integridade acrossômica, entre elas, a microscopia eletrônica, e microscopia de luz combinadas com colorações como Spermac e Wells e Awa (Wells & Awa, 1970). Técnicas de Imunofluorescência indireta que utilizam anticorpos monoclonais (Blach et al., 1988; Zhang et al., 1990) também são utilizadas para verificar o status do acrossoma do espermatozóide de garanhão, mas os anticorpos não são adquiridos facilmente. Uma técnica muito utilizada, é a ligação de lectinas coradas com fluorescência como concavilina conjugada com isocianato de fluoresceína (FITC-ConA: Blanc et al., 1991) ou conjugado de fluoresceína com aglutinina *Pisum sativum* (FITC-PSA: Farlin et al., 1992). Cheng et al. (1996) relatam que a ligação com isocianato de fluoresceína conjugada com aglutinina *Arachis hypogea* (FITC-PNA) tem sido bastante utilizada também.

Paqra Didion et al. (1989), a técnica de coloração dupla (Trypan Blue e Giemsa) é um procedimento simples para a detecção da viabilidade e estado do acrossoma e consiste da utilização dos corantes vitais trypan blue para detectar espermatozóides vivos e mortos e giemsa para diferenciar acrossoma intacto de acrossoma reagido. Silva (1998) relata que esta técnica tem sido bastante utilizada na espécie bovina.

#### **2.5.5. Integridade de DNA**

De acordo com Lewis & Aitken (2005), o rápido avanço na área de Biologia Molecular proporcionou o desenvolvimento de várias técnicas de acesso à qualidade da cromatina. Destas, o COMET, TUNEL, técnica de avaliação de estrutura da cromatina espermática - TAECE, e teste de orange acridine - TOA

(Evenson et al., 2002; Agarwal & Said, 2004) têm apresentado melhor qualidade de prognóstico na previsão de tratamentos para infertilidade.

O corante orange acridine reflete a desnaturação da cromatina do espermatozóide. O corante fluoresce de verde quando se intercala com um monômero no DNA (fita dupla e normal) e de vermelho quando se agrega a DNA desnaturado (única fita). A utilização do mesmo tem sido amplamente aceita para detecção de dano no DNA em vários tipos de células. Estudos na área de reprodução humana acreditam ser o TAECE o método mais eficiente para mensuração de milhares de espermatozóides, já que utiliza citometria de fluxo, em um mesmo ejaculado e o método de maior sucesso em obtenção de diagnósticos e prognósticos do potencial de fertilidade em humanos (Evenson et al., 2002).

Tejada et al. (1984) introduziu um teste de orange acridine (TOA) realizado por microscopia de epifluorescência. Este teste é um método mais simplificado de TAECE que não requer citometria de fluxo. Ambos os métodos avaliam a susceptibilidade do DNA nuclear a sofrer desnaturação ácido-induzida através da transformação do corante verde (fita dupla e normal) para vermelho (DNA desnaturado). Segundo Evenson et al. (2002), embora seja uma técnica muito simples e mais viável, existem controvérsias quanto à sua exatidão devido à rápida perda de fluorescência, à variabilidade entre as amostras e pela quantidade de células avaliadas ser bem menor que a quantidade de células avaliadas por TAECE.

### **2.5.6. Avaliação de estresse oxidativo**

Vários métodos são utilizados para mensurar a quantidade de ROS na superfície celular, bem como intra ou extracelular. Atualmente, os métodos mais utilizados para mensuração direta são os testes de quemiluminescência com luminol (Sharma & Agarwal, 1996; Griveau et al., 1998; Kobayashi et al., 2001) e o de redução de Nitroblue Tetrazolio (Saleh & Agarwal, 2002; Esfandiari et al., 2003). Para mensuração indireta, pode-se avaliar níveis de peroxidação lipídica (Ball et al., 2001; Ball & Vo, 2001) e de anti-oxidantes enzimáticos (Ball et al., 2000) e não-

enzimáticos (Sharma & Agarwal, 1996).

A dosagem de malondialdeído pode ser utilizada como marcador do índice de peroxidação lipídica (Aitken, 1993b; Janero, 1990; Sidhu et al., 1998; Slater, 1984). A ocorrência de peroxidação lipídica em espermatozóides resulta em um acúmulo progressivo de hidroperóxidos lipídicos na membrana espermática que, posteriormente, se decompõem para formas de malondialdeído. Entre os diferentes métodos já estabelecidos, a reação com o ácido tiobarbitúrico tem sido muito utilizada. Nesta reação, o composto formado pela reação entre o malondialdeído e o ácido 2-tiobarbitúrico pode ser mensurado através de fluorescência ou absorbância. Os produtos formados são chamados de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para Janero (1990), entre algumas desvantagens que se pode citar neste método, está a alta temperatura e o baixo pH, que podem causar formação de produtos de peroxidação relacionados com a própria técnica. Além disso, diferentes substâncias, outras que não o malondialdeído, podem reagir com ácido tiobarbitúrico, resultando em produtos de semelhante absorbância. Segundo o mesmo autor, no entanto, a correlação entre valores esperados de peroxidação lipídica e a mensuração dos níveis de TBARS é alta.

Em um estudo realizado por Zabludovzky et al. (1999), verificou-se níveis de TBARS em amostras de sêmen humano inversamente correlacionados com taxas de fecundação *in vitro*. Os níveis de TBARS foram significativamente maiores nas amostras que possuíam taxa de fecundação igual a zero, ao serem comparadas com amostras com taxa de fecundação maior que zero.

Para identificação de proteínas oxidadas, métodos de identificação de grupos carbonil têm sido bastante utilizados em vários tipos de tecidos. Os derivados do carbonil são os produtos mais relevantes resultantes do ataque dos radicais livres às proteínas. Dalle-Donne et al. (2003) explicam que o 2,4 dinitrofenil hidrazina (DNPH) é um reagente que se liga ao grupo carbonil e se transforma em uma molécula estável chamada dinitrofenil hidrazona (DNP), podendo ser mensurado por espectrofotômetro, ELISA e eletroforese em gel seguida de Western Blot. Segundo Hermes-Lima (2004), outras formas de identificação de proteínas carboniladas estão baseados em detecção por imunohistoquímica e separação por

HPLC.

Para Dalle-Donne et al. (2003), a utilização de grupos carbonil como biomarcadores de estresse oxidativo possui algumas vantagens se comparado com outras técnicas de mensuração de produtos de oxidação devido a sua rápida formação e à relativa estabilidade das proteínas carboniladas

### **3. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen eqüino.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na motilidade, vigor, integridade de membrana, de acrossoma e DNA do espermatozói­de eqüino.
  
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na proteção contra estresse oxidativo através da avaliação de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; SAID, T.M. **Sperm Chromatin assessment.** In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham A (eds) *Textbook of assisted reproductive technology and clinical perspectives, 2nd edn.* Taylor & Francis, London, 2004: pp 93-106.

AHMADI, A.; NG, S.C. **Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa.** *J Exp Zool* 1999;284(6);696-704.

AITKEN, R.J. **Free radicals, lipid peroxidation and sperm function.** *Reprod Fertil Dev* 1995;7(4);659-668.

AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. **Use of xanthine oxidase generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa.** *J Reprod Fertil* 1993a;97(2);441-450.

AITKEN, R.J.; FISHER, H. **Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance benefit and risk.** *Bioassays* 1994;16(4);259-267.

AITKEN, R.J.; FISHER, H.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; KNOX, W.; LEWIS, B.; IRVINE, B.; IRVINE, S. **Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine.** *Mol Reprod Dev*, 1997;47(4); 468-482.

AITKEN, R.J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J.P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D.S. **Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa.** *Biol Reprod* 1998a;59(5);1037-1046.



AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D.W. **Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa.** *Mol Reprod Develop* 1993b:35(3);302-315.

AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; KNOX, W.; PATERSON, M.; IRVINE, D.S. **A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox-regulated, camp-mediated induction of tyrosine phosphorylation.** *J Cell Sci* 1998b:111;645-656.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; ET AL. **The plasma membrane.** In:\_\_\_\_. *Molecular biology of the cell.* 2. ed. New York: Garland Publishing cap. 6. 1989:p.275-340.

ALMEIDA, J.; BALL, B.A. **Effect of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa.** *An Reprod Sci* 2005:87;321–337.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. **Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation.** *J Androl* 1992:13;232-241.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. **Spermatozoal function.** In: McKinnon, AO, Voss JL. *Equine reproduction. Pennsylvania: Lea & Febiger, cap. 80.* 1993:p.715-45.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. **Principles of cryopreservation of stallion spermatozoa.** *Eq Vet Sci* 1987:7;145-73.

ANGOLA, A.P. **Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen.** *Vet Méx* 1994: v.25; n.3,p.207.

AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. **Seminal plasma affects**

**membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation.**

*Theriogenology* 1996;46:791-797.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F., CORMIER, N. **Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon.** *J Androl* 2000;21(1);1-7

BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. **The impact of cryopreservation on Ca<sup>2+</sup> regulation by bovine spermatozoa.** *Can J An Sc* 1994;74;45-52.

BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; BAUMBER, J.; LIU, I.K. **Catalase activity in equine semen.** *Am J Vet Res* 2000;61(9);1026-1030.

BALL, B.A.; VO, A.T. **Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential.** *J Androl* 2001;22(6);1061-1069.

BALL, B.A.; VO A.T.; BAUMBER, J. **Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa.** *Am J Vet Res* 2001;62(4); 508-515.

BANFI, B.; MOLNAR, G.; MATURANA, A.; STEGER, K.; HEGEDUS, B.; DEMAUREX, N.; KRAUSE, K.H. **A Ca<sup>2+</sup> activated NADPH Oxidase In testis, Spleen, and Lymph Nodes.** *J Biol Chem* 2001;276;37594-37601.

BATALLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. **Advances in cooled semen technology.** *Anim Reprod Sci* 2001;68(3-4),181-190.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C. **The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid**

**peroxidation.** *J Androl* 2000:21(6);895-902.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. **Reactive Oxygen Species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa.** *J Androl* 2003:24(4);621-628.

BEDFORD, S.J.; MEYERS, S.A.; VARNER, D.D. **Acrosomal status of fresh, cooled and cryopreserved stallion spermatozoa.** *J Reprod Fertil* 2000:56(suppl.);133-40.

BEGLEY, A.J.; QUINN, P. **Decapacitation factors in semen.** *Clin Reprod Fertil* 1982:1(3);167-75.

BEN, W.X.; FU, M.T.; MAO, L.K.; MING, Z.W.; XIONG, W.W. **Effects of various concentrations of native seminal plasma in cryoprotectant on viability of human sperm.** *Arch Androl* 1997:39(3);211-6

BILODEAU, J.F.; CHATEERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. **Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing.** *Mol Reprod Dev* 2000:55(3);282-288

BLACH, E.L.; AMANN, R.P.; BOWEN, R.A.; SAWYER, H.R.; HERMENET, J.M. **Use of a monoclonal antibody to evaluate integrity of the plasma membrane of stallion sperm.** *Gamet Res* 1988:21(3);233-241.

BLANC, G.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. **Use of Concanavalin A for coating the membranes of stallion spermatozoa.** *J Reprod Fertil Suppl* 1991:44;191-198.

BLANDAU, R.J. **Gamete Transport in the female mammal.** *In: Handbook of physiology, Sect. 7, Endocrinology, vol. II.* 1973 (chapter 38).

BORDIGNON, V.; SMITH, L.C. **Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle.** *Biol Reprod* 1999;61;1513-20.

BOYLE, M.S. **Assessing the potential fertility of frozen stallion semen.** In: *Allen WR and Wade JF (eds.), Havemeyer Foundation Monography series No. 1. R & W Publications Ltd, Newmarket.* 1999;pp.13-16.

BRAUN, J.; TORRES-BOGGINO, F.; HOCHI, S.; OGURI, N. **Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5 degrees.** *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1994;Aug;101(8):319-22.

CHANTTERJEE, S.; GAGNON, C. **Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing.** *Mol Reprod Dev* 2001;59(4);451-458.

CHEN, C.S.; CHAO, H.T.; PAN, R.L.; WEI, Y.H. **Hydroxyl radical-induced decline in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm.** *Biochem Mol Biol Int* 1997;43(2); 291-303.

CHENG, F.P.; FAZELI, A.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B. **Use of PNA (peanut agglutinin) to assess the acrosomal status and the zona pellucida induced acrosome reaction in stallion spermatozoa.** *J Androl* 1996;17(6); 674-682.

CIOLINO, H.P.; LEVINE, R.L. **Modification of proteins in endothelial cell death during oxidative stress.** *Free Radic Biol Med* 1997;22(7);1277-1282.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2ed, *Belo Horizonte, CBRA*, 1998:49p.

CORMIER, N.; BAILEY, J.L. **A differential mechanism is involved during heparin-and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa.** *Biol Reprod* 2003;69(1);177-85.

CRISTANELLI, M.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. **Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure.** *Theriogenology* 1984;22,39-45.

DACHEUX, J.L.; CASTELLA, S.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. **Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation.** *Theriogenology* 2005;63(2);319-41.

DACHEUX, J.L.; DACHEUX; F. **Protein secretion in the epididymis.** *In: Robaire B, Hilton BT, editors. The epididymis: from molecules to clinical practice. A comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas deferens. New York: Kluwer Academic/Plenun Publishers. 2002:p.151-68.*

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. **Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with threalose and methyl cellulose.** *Theriogenology* 1997: v.48; n.5, p.831-841.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. **Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress.** *Clin Chim Acta*, 2003;329(1-2); 23–38.

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. **The plasma membrane.** *In:\_\_\_ . Molecular cell biology. 2. ed. New York: Scientific American Books, cap. 13. 1990:p.491-530.*

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. **Impact of reactive oxygen species on**

**spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects.** *Hum Reprod* 1995a:10(suppl 1);15-21.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. **Capacitation-associated production of superoxide anion human spermatozoa.** *Free Radic Biol Med* 1995b:18(3);487-495.

DE LAMIRANDE, E., GAGNON, C. **The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function.** *In:Gagnon C (ed), The Male Gamete: From Basic Science to clinical Application. Vienna, IL: Cache River Press; 1999:445-467.*

DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O.; ZHAN, F.S.; ALVARENGA, M.A.; LEONARDO, H. **Novo teste osmótico de avaliação da integridade de membrana plasmática de sêmen congelado eqüino.** *Rev Bras Reprod Anim* 2002:26, n.3, jul/set.

DE ROOIJ, D.G.; RUSSELL, L.D. **All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask.** *J Androl* 2000:21(6);776-98.

DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J.R.; GRAVES, C.N. **Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species.** *Gamet Res.*, 1989: 22(1); 51-57.

DONELLY, 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* 1999:14(5);505-512.

DONELLY, E.T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S.E. **Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters an DNA integrity.** *Fertil Steril* 2001:76(5); 892-900.

DREVIUS, L.O. **Osmotic behaviour, membrane permeability and mobility**

**mechanisms in bull spermatozoa.** *Acta Univers Upsaliensis* 1972:5;195.

DUCCI, M.; TEDESCHI, D.; VILLANI, C.; GAZZANO, A.; SIGHIERI, C.; MARTELLI, F. **Functional correlations of frozen equine sperm with superoxide dismutase activity.** *J Eq Vet Sc* 1999:19, 583; Ref Type:Abstract

EDWARDS, J.J.; TOLLAKSEN, S.L.; ANDERSON, N.G. **Proteins of human semen. I. Two-Dimensional mapping of human seminal fluid.** *Clin Chem* 1981:1335-1340.

ELLINGTON, J.E.; SAMPER, J.C.; JONES, A.E.; OLIVER, S.A.; BURNETT, K.M.; WRIGHT, R.W. **In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products.** *Anim Reprod Sci* 1999:56;51-65.

ENGLAND, G.C. **Cryopreservation of dog semen: a review.** *J Reprod Fertil Suppl* 1993:47;243-255.

ESFANDIARI, N.; SHARMA, R.K.; SALEH, R.A.; THOMAS, A.J.Jr.; AGARWAL, A. **Utility of Nitroblue Tetrazolium Reduction Test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa.** *J Androl* 2003:24(6);862-870.

EVANS, J.P.; FLORMAN, H.M. **The state of the union: the cell biology of fertilization.** *Nat Cell Biol* 2002:4Suppl;s57-63.

EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. **Sperm Chromatin Structure Assay: Its clinical use for detecting sperm fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques.** *J Androl* 2002:23(1);25-43.

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. **Assessment of**

**Pisum sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa.** *Mol Reprod Dev* 1992;32(1); 23-27.

FASTARD, W. **Semen cryopreservation of dog and foxes.** *An Reprod Sci* 1996;12;145-150,

FATEHI, A.N.; BEVERS, M.M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. **DNA damage in bovine sperm cells does not block fertilization but induces apoptosis after the first cleavages.** *J Androl* 2006.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. **Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization.** *Biochim Biophys Acta* 2000;1469(3);197-235.

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO. **In: Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** Belo Horizonte. *Anais do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*, 1992: p.40.

FRANCA, L.R.; AVELAR, G.F.; ALMEIDA, F.F. **Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs.** *Theriogenology* 2005;63(2);300-318.

GAO, D.Y.; LIU, J.; LIU, C.; MCGANN, L.E.; WATSON, P.F.; KLEINHANS, F.W.; MAZUR, P.; CRITSER, J.K. **Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis.** *Biol Reprod* 1993;49(1); 112-123.

GARNER, D.L.; PNKEL, D.; JONSON, L.A.; ET AL. **Assessment function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses.** *Biol Reprod*



1986:34(1);127-138.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. **Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed.** *Theriogenology* 2002:58;277-279.

GRAHAM, J.K. **Cryopreservation of stallion spermatozoa.** *Vet Clin North Am Equine Pract* 1996:12(1);131-47.

GREEN, C.E.; WATSON, P.F. **Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation.** *Reproduction* 2001:122(6);889-898.

GRIVEAU, J.F.; DUMONT, E.; RENARD, P.; CALLEGARI, J.P.; LE LANNOU, D. **Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa.** *J Reprod Fertil* 1995:103; 17-26.

GRIVEAU, J.F.; GRIZARD, G.; BOUCHER, D.; LE LANNOU, D. **Influence of oxygen tension on function of isolated spermatozoa from ejaculates of oligozoospermic patients and normozoospermic fertile donors.** *Hum Reprod* 1998: Nov;13(11); 3108-13.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Papel de antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura).** *Ve Brás Reprod Anim* 2004:v.28,n.4;p.187-195. out/nov.

HAARD, M.C.; HAARD, M.G.H. **Successful commercial of frozen stallion semen abroad.** *J Reprod Fertil* 1991:44 (Suppl.), 647-648.

HARRISON, R.A. & VICKERS, S.E. **Use of fluorescent probes to assess**

**membrane integrity in mammalian spermatozoa.** *J Reprod Fertil* 1990;88(1);343-52.

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L. ET AL. **Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa.** *Equine Vet J* 1996;28(1);47-53.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals (chapter 12).** In: **Functional Metabolism Regulation and Adaptation.** *Editado por KB Storey, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA, 2004:319-368.*

HIDEKI, F.; MASASHI, I.; TAKASHI, K. **Correlation between the hypoosmotic swelling test and various sperm function tests.** *Int J Fertil* 1993;38(5); 311-315.

HUGUES, C.M.; LEWIS, S.E.; MCKELVEY-MARTIN, V.J.; THOMPSON, W. **A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using modified comet assay.** *Mol Hum Reprod.* 1996;2(8);613-619.

HUNTER, R.F.H. **How, when and where do spermatozoa gain their fertilizing ability in vivo?** *Reprod Domest Anim* 1996;31;51-5.

IWASAKI, A.; GAGNON, C. **Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients.** *Fertil Steril* 1992;57(2);409-16.

JANERO, D.R. **Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity indices if lipid peroxidation and peroxidative injury.** *Free Rad Biol Med* 1990;9(6);515-540.

JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P., PICKETT, B.W. **Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed**

**stallion semen.** *Proc 38th Ann Conv AAEP* 1992:pp.649-660.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. **Development of an assay to assesses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.** *J Reprod Fertil* 1984:70;219-228.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; ZANEVELD, L.J. **The hipoosmotic swelling test: an update.** *Arch Androl* 1992:29(2);105-116.

JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. **Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma.** *Fertil Steril* 1979;31(5):531-537.

KATILA, T.; ANDERSON, M.; REILAS, T.; KOSKINEN, E. **Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates.** *Theriogenology* 2002:58;241-4.

KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W.L.; and MORSE, G. W. **Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings.** *Proc Annu Conv Am Assoc Eq Pract* 1975:21,327-36.

KOBAYASHI, H.; GIL-GUZMAN, E.; MAHRAN, A.M.; RAKESH; NELSON, D.R.; THOMAS, A.J.Jr.; AGARWA, A. **Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay.** *J Androl* 2001:22(4);568-574.

LADHA, S. **Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon.** *J Membr Biol* 1998:165(1); 1-10.

LASSO, J.L.; NOILES, E.E.; ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. **Mechanism of**

**superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation.** *J Androl* 1994; 15(3); 255-265.

LEIBO, S.P.; BRADLEY, L. **Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa.** In: GAGNON, C. (ed). *The male gamet: from basic science to clinical applications.* Vienna: Cache River Press, 1999:p.501-516.

LEWIS, S.E.; AITKEN, R.J. **DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy.** *Cell Tissue Res* 2005;322(1); 33-41.

LINFOR, J.J., MEYERS, S.A. **Detection of cryopreservation induced DNA damage in response to cooling injury in equine sperm using single cell gel electrophoresis.** *J Androl.* 2002;23(1);107-13.

LOMEO, A.M.; GIAMBERSIO, A.M. **Water test: A simple method to assess sperm membrane integrity.** *Int J Androl* 1991;14(4); 278-282.

MACLEOD, J. **The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa.** *Am J Physiol* 1943;138;512-518.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen.** *Springer Berlin.* 1981.

MAZUR, P. **Cryobiology: the freezing of biological systems.** *Science* 1970;168(934);939-949

MCKINNON, A.O. **Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen.** *Austr Eq Vet. J* 1996: v.14; p.156-175.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. **Cryopreservation of stallion sperm using different amides.** *Theriogenology*

2002:58;273-276.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. **Heparin Biding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin.** *Biol Reprod* 1990:42;899-915

MINELLI, A.; MORONI, M.; MARTINEZ, E.; MEZZASOMA, I.; RONQUIST, G. **Occurrence of prostasome-like membrane vesicles in equine seminal plasma.** *J Reprod Fertil* 1998:114(2);237-243

MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. **Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa.** *Theriogenology* 2005:63(9);2372-2381.

MORRIS, L.H.A.; STOUT, T.E.; LI, X.; ALLEN, WR. **The capacitation status of fresh and frozen-thawed epididymal and ejaculated stallion spermatozoa.** *Theriogenology* 2000:53,488; Ref Type:Abstract

MORRIS, L.H.; TIPLADY, C.; ALLEN, W.R. **Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction.** *Equine Vet J* 2003:35(2);197-201.

MORTIMER, S.T.; SWAN, M.A.; MORTIMER, D. **Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa.** *Human Reprod* 1998:13;2139-46.

NEILD, D.N.; GADELLA, B.M.; AGUERO, A.; STOUT, T.A.; COLENBRANDER, B. **Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm.** *Anim Reprodn Sc* 2005:89(1-4);47-56.

NEILD, D.M.; GADELLA, B.M.; CHAVES, M.G.; MIRAGAYA, M.H.;

COLENBRANDER, B.; AGUERO, A. **Membrane changes during different stages of freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation.** *Theriogenology* 2003:59(8);1693-1705.

PICKETT, B.W. **Principles of cryopreservation.** In: *TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS. Proceedings...* Fort Collins: Colorado State University, 1986: p.1-5

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. **Cryopreservation of semen.** In: MICKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (ed). *Equine Reproduction.* Philadelphia: Lea & Fegiber, 1993: p.769-789.

PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O. **Procedures for collection, evaluation, and utilization of stallion semen for artificial insemination.** *Fort Collins: Colorado State University.* 1987: 125p. (Bulletin, 03).

PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W.; PACE, M.M.; REMMENGA, E.E. **Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa.** *Fertil Steril* 1975:26(2);167-174.

POTTS, R.J.; NOTARIANNI, L.J.; JEFFERIES, T.M. **Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation.** *Mutat Res* 2000:447(2);249-256.

RAO, A.R. **Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulls with normal and impaired spermatogenesis.** *Thesis.* Royal Vateriaary College of Stockolm. 1971:79 p.

RATH, D.; TOPFER-PETERSEN, E.; MICHELMANN, H.W.; SCHWARTZ, P.; EBELING, S. **Zona Pellucida characteristics and sperm-binding patterns of in**

**vivo and in vitro produced porcine oocytes inseminated with differently prepared spermatozoa.** *Theriogenology* 2005:63(2);352-362.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SARAIVA, F.; WALLGREN, M.; TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A.; VAZQUEZ, J.M.; ET AL. **Boar spermatozoa in the oviduct.** *Theriogenology* 2005:63(2);514-535.

ROTMAN, B.; PAPERMASTER, B.W. **Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic ester.** *Biochem* 1966:55;134-41.

SALEH, R.A.; AGARWAL, A. **Oxidative stress and Male infertility: From research Bench to clinical Practice.** *J Androl* 2002:23(6);737-52.

SANTOS, O.E.C. **Viabilidade in vitro do sêmen de cão submetido a congelação com diferentes diluidores e crioprotetores.** *Belo Horizonte, MG: UFMG. 60f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária da Universidade federal de Minas gerais, 2003.*

SCHEMBRI, M.A.; MAJOR, D.A.; SUTTIE, J.J.; MAXWELL, W.M.; EVANS G. **Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process.** *Reprod Fertil Dev* 2002:14(3-4);225-233.

SELI, E.; GARDNER, D.K.; SCHOOLCRAFT, W.B.; MOFFATT, O.; SAKKAS, D. **Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocysts development after in vitro fertilization.** *Fertil Steril* 2004:82(2);378-383.

SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. **Role of reactive oxygen species in male infertility (review).** *Urology* 1996:48(6); 835-850.

SHIDU, R.S.; SHARMA, R.K.; THOMAS, J.R.; AGARWAL, A.J. **Relationship between creatinine kinase and semen characteristics in sub-fertile men.** *International Journal of Fertility and women's. Medic* 1998;43;192-197.

SILVA, A.E.D.F. **Reação Acrossômica induzida: método indicador de fertilidade em touros.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos, 35*), 1998. 38 p.

SILVA, P.F.; GADELLA, B.M. **Detection of damage in mammalian sperm cells.** *Theriogenology* 2006;65(5);958-978.

SLATER, T.F. **Overview of methods used for detectiong lipid peroxidation.** *Meth Enzimol* 1984;105;283-293

STADTMAN, E.R. **Trends** *Biol Sci* 1986;11; 11-12.

STOREY, B.T. **Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa.** *Mol Human Reprod* 1997;3(3); 203-213.

STRYER, L. **Introdução ao estudo das membranes biológicas.** *In: \_\_.* *Bioquímica. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12.* 1992: p. 230-56.

TEJADA, R.I.; MITCHELL J.C.; NORMAN, A. MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. **A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence.** *Fertile Steril* 1984;42(1); 87-91.

THOMASSEN, R. **Insemination with stallion semen frozen in 0.5 ml straws.** *Reprod Dom Anim* 1993;28;289-293.

TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. **Analysis of the**



**impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants.** *Human Reprod* 1998;13(6);1429-1436.

VAN DER SCHANS, G.P.; HARING, R.; VAN DIJK-KNIJNENBURG, H.C.; BRUIJNZEEL, P.L.; DEN DAAS, N.H. **An Immunochemical assay to detect DNA damage in bovine sperm.** *J Androl* 2000;21(2);250-257.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. **Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice.** *Theriogenology* 2002;57(1);149-179,.

VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P.; BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. **Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide.** *Theriogenology* 2002;58:249-251.

VOLKMANN, D.H.; VAN ZYL, D. **Fertility of stallion semen frozen in 0.5-ml straws.** *J Reprod Fertil Suppl* 1987;35; 143-148.

WARREN, J.S.; JOHNSON, K.J.; WARD, P.A. **Oxygen radicals in cell injury and cell death.** *Pathol Immunopathol Res* 1987;6; 301-315.

WATSON, P.F. **Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function.** *Reprod Fertil Dev* 1995;7(4);871-891.

WATSON, P.F. **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.** *Anim Reprod Sci* 2000: 60-61;481-492.

WELLS, M.E.; AWA, O.A. **New technique for assessing acrosomal**

**characteristics of spermatozoa.** *J Dairy Sci.* 1970: 53(2); 227-232.

YANAGIMACHI, R. **Mammalian fertilization.** *In: Knobil, E, Neil JD (Eds.), The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York. 1994:pp.189-317.

ZABLUDOVSKY, N., ELTES, F.; GEVA, E.; BERKOVITZ, E.; AMIT, A.; BARAK, Y.; HAR-EVEN, D.; BARTOOV, B. **Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome.** *Androl* 1999:31(2);91-98.

ZHANG, J.; BOYLE, M.S.; SMITH, C.A.; MOORE, H.D. **Acrosome reaction of stallion spermatozoa evaluated with monoclonal antibody and zona-free hamster eggs.** *Mol Reprod Dev* 1990:27(2);152-158.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina.** *Tese de doutorado apresentada em Botucatu, SP,* 1998.

## **6. CAPÍTULO ÚNICO**

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PLASMA SEMINAL NA PROTEÇÃO CONTRA ESTRESSE OXIDATIVO E NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA DURANTE A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQÜINO**

Trabalho submetido à publicação na revista Theriogenology, Elsevier, Estados

Unidos.

## EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PLASMA SEMINAL NA PROTEÇÃO CONTRA ESTRESSE OXIDATIVO E NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA DURANTE A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQÜINO

Juliana Lopes Almeida<sup>1</sup>, Roberto Andrade Júnior<sup>2</sup>, Marina Ferreira Zimmermann<sup>1</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>3</sup>, Jairo Pereira Neves<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brasil;

<sup>2</sup> Grupo de Pesquisa de oxiradicaís, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brasil;

<sup>3</sup> Cenargen – Embrapa, Brasília, DF 70770-900, Brasil.

### RESUMO

A baixa fertilidade é um dos fatores que restringe o uso da criopreservação de sêmen na espécie eqüina. Durante o congelamento, os espermatozoides sofrem vários danos, tais como alterações na membrana, capacitação prematura, alterações no DNA e estresse oxidativo. Os espermatozoides são suscetíveis ao estresse oxidativo devido, principalmente, à grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas suas membranas e pela baixa concentração de enzimas antioxidantes no seu citoplasma. A reduzida fertilidade, muitas vezes, tem sido correlacionada com a baixa capacidade antioxidante do sêmen e tal fato pode se dar devido à retirada do plasma seminal durante o processo de criopreservação. Estudos recentes têm demonstrado efeito benéfico do plasma seminal no armazenamento dos espermatozoides eqüinos submetidos ao resfriamento ou congelamento. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de plasma seminal na proteção contra o estresse oxidativo e danos na viabilidade da célula espermática. Foram utilizados 4 garanhões, sendo congeladas 4 partidas de cada animal. Após a colheita o plasma seminal foi retirado e os espermatozoides ressuspensos em diluente contendo diferentes

concentrações de plasma 0% (T1), 5% (T2), 25% (T3) e 50% (T4). As análises realizadas pós-descongelamento foram motilidade, vigor, morfologia, integridade de membrana, integridade de acrossoma, integridade de DNA, peroxidação lipídica e proteína carbonilada. A adição de plasma seminal não afetou ( $p>0,05$ ) a morfologia espermática e a integridade de DNA. Espermatozoides congelados com 5% de plasma seminal (T2) foram semelhantes ao controle (T1) em todas as variáveis estudadas ( $p>0,05$ ), com exceção da peroxidação lipídica, que foi maior ( $p<0,05$ ) no tratamento sem plasma (T1). O T4 apresentou menor ( $p<0,05$ ) motilidade, vigor, percentagem de células com membrana íntegra e acrossoma intacto. Efeitos do plasma seminal na proteção contra oxidação de proteínas não foram observados ( $p>0,05$ ). Em conclusão, o plasma seminal possui efeito antioxidante durante criopreservação, entretanto esse efeito não protege a viabilidade das células espermáticas de outros danos decorrentes da criopreservação, podendo, inclusive acentuar esses danos quando utilizado em concentrações de 25% ou mais.

**Palavras chaves:** criopreservação, equino, estresse oxidativo, plasma seminal, viabilidade espermática

## **EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF SEMINAL PLASMA ON PROTECTION AGAINST OXIDATIVE STRESS AND CELL VIABILITY ON CRYOPRESERVATION OF EQUINE SPERMATOZOA**

### **ABSTRACT**

One of the major limiting factors of equine frozen semen is the low fertility obtained. During freezing process spermatozoa undergoes a series of damages such as changes in membrane components, premature capacitation, chromatin damages and oxidative stress. Sperm cells are very susceptible to oxidative stress due to high concentration of polyunsaturated fatty acids in the membrane and low concentration of antioxidant enzymes in their cytoplasm. It has been shown that there is a correlation between low antioxidant capacity of semen and fertility of the

animal and it may be due to seminal plasma removal during cooling or freezing process. Recent studies have shown a beneficial effect of seminal plasma in the storage of equine spermatozoa either by cooling or by cryopreservation. The objective of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of seminal plasma in the protection against oxidative stress during cryopreservation of equine spermatozoa, and to verify that effect in cell viability. In this experiment, four stallions were used and four ejaculates were obtained from each animal. After collection, seminal plasma was removed and spermatozoa resuspended in extender with seminal plasma in different concentrations 0% (T1), 5% (T2), 25% (T3) e 50% (T4). Motility, vigor, morphology, membrane, acrosome and DNA integrity, lipid peroxidation and protein oxidation were analyzed after freezing and thawing. Seminal plasma did not affect ( $p>0,05$ ) sperm morphology and DNA integrity. Frozen spermatozoa with 5% (T2) of seminal plasma were similar ( $p>0,05$ ) to control (T1) in all variables studied, except in lipid peroxidation analysis, in which the results were higher ( $p<0,05$ ) in control in comparison with the other treatments. T4 presented lower ( $p<0,05$ ) motility, vigor, membrane and acrosome intact cells percentage. Effect of seminal plasma protection against protein oxidation was not observed ( $p>0,05$ ). In conclusion, seminal plasma presented antioxidant effect during cryopreservation, however, this effect does not protect the spermatozoa viability from other cryopreservation damages and it may even exacerbate these damages in concentrations of 25% or higher.

**Key words:** cryopreservation, equine, oxidative stress, seminal plasma, sperm viability

## 6.1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen já vem sendo utilizada ao longo de 50 anos na indústria bovina. Apesar disso, a sua utilização na espécie eqüina continua limitada (Watson, 2000).

Um dos fatores que restringe o uso desta técnica é a baixa fertilidade obtida com sêmen congelado quando comparado com sêmen fresco ou resfriado. A reduzida fertilidade observada no sêmen eqüino se deve a vários fatores, entre eles destaca-se a grande variabilidade individual, a reduzida vida útil do sêmen no trato reprodutivo da fêmea, causada principalmente por induções prematuras de reação de acrossoma (Morris et al., 2003) e pelas alterações provocadas pelos processos de resfriamento e congelamento.

Durante o congelamento, os espermatozóides sofrem vários danos, tais como: queda de motilidade (Zúccari, 1998); alterações na membrana (Alberts et al., 1989), capacitação prematura (Bedford et al., 2000; Green & Watson, 2001; Schembri et al., 2002; Cormier & Bailey, 2003; Neild et al., 2003), alterações na integridade do DNA (Baumber et al., 2003) e estresse oxidativo (Ball et al, 2001).

O estresse oxidativo no sêmen ocorre como resultado de um desequilíbrio entre produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e sua capacidade antioxidante. Os espermatozóides são suscetíveis ao estresse oxidativo devido, principalmente, à grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes nas suas membranas (Alvarez & Storey, 1992) e pela baixa concentração de enzimas antioxidantes no seu citoplasma (de Lamirande & Gagnon, 1995a; Sharma & Agarwal, 1996).

Apesar do plasma seminal conter componentes de proteção contra os efeitos deletérios dos radicais livres como a vitamina E, vitamina C, urato, albumina, taurina e hipotaurina (Baumber et al, 2000), a reduzida fertilidade, muitas vezes, tem sido correlacionada com a baixa capacidade antioxidante do sêmen (Guerra et al., 2004). Portanto, a proteção contra ROS e a prevenção de danos celulares devido às ações antioxidantes do plasma seminal é um fator importante para o potencial

reprodutivo em eqüinos.

Está bem estabelecido que o plasma seminal tem papel de proteção contra o estresse oxidativo. Entretanto, na maioria dos protocolos de criopreservação e resfriamento de espermatozóides eqüinos, o plasma é removido e/ou tem sua proteção reduzida pela adição de diluentes (Moore et al, 2005). De acordo com Amann & Pickett (1987), a remoção do plasma seminal é necessária para a sobrevivência dos espermatozóides criopreservados. No entanto, estudos recentes têm demonstrado efeito benéfico do plasma seminal no armazenamento dos espermatozóides eqüinos durante o resfriamento ou congelamento (Katila et al., 2002; Moore et al, 2005).

Tendo em vista que o plasma seminal é uma fonte natural de proteção das células espermáticas, pode-se supor que a presença de seus componentes durante a criopreservação proteja os espermatozóides eqüinos por diminuir o estresse oxidativo e, conseqüentemente, melhore a capacidade de sobrevivência dessas células.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na proteção contra o estresse oxidativo e seus efeitos na viabilidade espermática durante a criopreservação de sêmen eqüino.

## **6.2. MATERIAL E MÉTODOS**

As colheitas e os congelamentos de sêmen foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizada na Fazenda Experimental Sucupira, Brasília, DF. Foram utilizados quatro garanhões, dois da raça Pantaneira e dois da raça Campeira, clinicamente sadios, com idade entre 4 e 15 anos, com o mesmo regime de alimentação a pasto.

Antes do início das colheitas, os animais foram submetidos a um exame andrológico e todos apresentaram características espermáticas dentro dos padrões aceitos para congelamento, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998).



### **6.2.1. Colheita e avaliação do sêmen**

Cada reprodutor foi submetido a um total de quatro colheitas, as quais foram realizadas com intervalos de dois dias durante o período experimental, de modo a manter um mesmo padrão de qualidade seminal. Para a colheita do sêmen utilizou-se vagina artificial, modelo Botucatu, com água aquecida a 42°C, tendo como manequim uma fêmea em estro. Após a colheita, realizou-se o exame imediato do ejaculado, considerando os seguintes itens: coloração, aspecto, volume, motilidade, vigor e concentração. A motilidade (0-100%) e o vigor (escala de 0 a 5) foram observados em microscópio em objetiva de 20X, utilizando uma gota de sêmen sobre uma lâmina pré-aquecida a 37°C e coberta por uma lamínula. Uma amostra de sêmen foi reservada para avaliação de concentração e cálculo do número de doses. Para o cálculo de concentração, foi utilizado a câmara de Neubauer, com sêmen diluído em solução de formol-salina na proporção de 1:20.

### **6.2.2. Processo de criopreservação**

Após a colheita, o sêmen foi separado em alíquotas iguais, em quatro tubos de 15 ml e os mesmos foram centrifugados a 600 g por 10 minutos. Após centrifugação, o plasma seminal foi retirado e armazenado em banho maria a 38°C para utilização nos diferentes tratamentos. Para ressuspensão utilizou-se meio diluente comercial para congelamento FR-4 (Nutricell®) com 5% de dimetilformamida e acrescido de diferentes concentrações de plasma seminal do próprio animal. A razão de utilização da dimetil-formamida como crioprotetor neste trabalho se deve aos bons resultados obtidos por alguns autores (Vidament et al., 2002; Gomes et al, 2002; Medeiros et al., 2002) quando utilizaram amidas, tais como acetamida, metil-formamida e dimetil-formamida como crioprotetores no congelamento de sêmen de eqüinos.

Os pellets resultantes foram ressuspensos conforme cada tratamento:

T1: somente em diluente (controle)

T2: diluente acrescido de 5% de plasma seminal.

T3: diluente acrescido de 25% de plasma seminal.

T4: diluente acrescido de 50% de plasma seminal.

O volume final de ressuspensão foi calculado de forma a se obter  $100 \times 10^6$  espermatozóide/ml. Para envase, foram utilizadas palhetas de 0,5 ml. As palhetas foram envasadas por aspiração, identificadas conforme o tratamento e lacradas com álcool polivinílico.

O sêmen foi, então, resfriado e estabilizado por 60 minutos em refrigerador a 5°C. Após período de estabilização, a bandeja contendo as palhetas foi transferida para um suporte em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido a uma distância de 4 cm acima do nível do nitrogênio. Nesse procedimento, as palhetas foram mantidas a uma temperatura próxima de -120°C, onde permaneceram por 20 minutos, sendo, então, mergulhadas em nitrogênio líquido e transferidas para um botijão criogênico a -196°C.

### **6.2.3. Descongelamento e avaliações**

As amostras foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos e depositadas em tubos eppendorf. A motilidade (0-100%) e vigor (0-5) espermáticos foram avaliados subjetivamente por microscopia ótica.

### **6.2.4. Morfologia Espermática**

A morfologia espermática foi avaliada utilizando-se 20 µl da amostra de sêmen diluída em 500 µl de solução de formol-salina. Após a diluição, uma amostra foi retirada para realização de preparação úmida e avaliação por microscopia de contraste de fase. Em cada lâmina foram contadas 200 células e classificadas conforme padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998).

### **6.2.5. Avaliação de Integridade de Membrana Plasmática (IMP)**

Para a avaliação de integridade de membrana utilizou-se a técnica descrita por Zúccari (1998) na qual adicionou-se 10 µl de sêmen descongelado em 40 µl de solução de trabalho contendo iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína. Logo após, fez-se uma preparação úmida da solução resultante e avaliou-se em microscópio de epifluorescência. Foram contatadas 200 células por lâmina, sendo que espermatozóides corados de vermelho foram considerados com membrana lesada e os corados de verde com membrana íntegra.

### **6.2.6. Avaliação de Integridade de Acrossoma (IA)**

Para avaliação de Integridade de acrossoma, utilizou-se a coloração Trypan Blue e Giemsa descrita por Didion et al. (1989), na qual acrescentou-se 20 µL de sêmen a 20 µL de Trypan Blue 0,4% em tubo eppendorf por 20 minutos a 37°C. Após incubação completou-se o tubo com meio Tyrode modificado (TALP; Parrish et al, 1995) sem albumina e centrifugou-se a 600 g por 6 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuscitado novamente no meio sem albumina. O processo foi repetido até que a suspensão ficasse azul pálido, sendo a ressuspensão final com 0,5 ml de TALP. Desta amostra foi feito um esfregaço, que foi fixado em metanol por 5 minutos e, depois de seco, imerso em Giemsa por 8-24h.

Foram contadas 200 células por lâmina e os espermatozóides encontrados foram classificados conforme a descrição abaixo:

- Espermatozóides mortos com acrossoma intacto – cabeça azul escuro ou roxa com acrossoma rosado;
- Espermatozóides mortos com acrossoma reagido – cabeça azul escuro ou roxa com acrossoma descolorado (ausente);
- Espermatozóides vivos com acrossoma intacto – cabeça azul claro com acrossoma rosado;

- Espermatozóides vivos com acrossoma reagido – cabeça azul claro com acrossoma descorado (ausente).

### **6.2.7. Avaliação de Integridade de DNA**

Para avaliação Integridade de DNA, a técnica utilizada foi o teste de *Orange Acridine* descrita por Tejada et al. (1984). Nesta técnica, as amostras foram descongeladas e centrifugadas com 2 ml de TALP a 700 g por 3 minutos para retirada do crioprotetor. O processo foi repetido por três vezes. Logo após, reconstituiu-se o pellet final com meio TALP. Confeccionou-se um esfregaço de cada amostra e fixou-se por um período de doze horas em solução de Carnoy fresca (metanol e ácido acético, em uma proporção de 3:1). No dia seguinte, os esfregaços foram secos e incubados com solução de ácido cítrico e fosfato sódico dibásico aquecida a 75°C durante 5 minutos. As lâminas foram novamente secas e, logo após, coradas com solução de *Orange Acridine* por 5 minutos em ambiente escuro. Por fim, lavou-se a frente da lâmina com jatos de água destilada para retirar excesso de corante e realizou-se a leitura de 200 células por lâmina, em microscópio de epifluorescência (490/530nm de excitação). Conforme preconiza a técnica, os espermatozóides corados de verde foram considerados com cromatina íntegra e os espermatozóides com cor diferente do verde (de amarelo a vermelho ou laranja) com cromatina danificada.

### **6.2.8. Avaliação de estresse oxidativo através do método de proteína carbonilada**

Esta técnica avalia a quantidade de carbonil, que são os produtos resultantes do ataque dos radicais livres às proteínas, utilizando 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH). Os grupos carbonil reagem com DNPH para formar 2,4-dinitrofenil hidrazona, que é quantificado em espectrofotômetro. Os resultados são apresentados em concentração de proteínas carboniladas por nanomol de amostra.

Para avaliação de proteínas carboniladas utilizou-se a técnica descrita por

Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima (2003), na qual as amostras descongeladas de sêmen foram homogeneizadas em ácido sulfosalicílico 5% p/v e centrifugadas a 15.000 g em uma centrífuga para eppendorfs por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e aos pellets foram adicionados 0,5 ml de 2,4 dinitrofenil hidrazina (10 mM em 2 M de HCl). Os tubos foram agitados vigorosamente (em um vórtex) a cada 15 minutos, durante 40 segundos. Após esse processo, adicionou-se aos tubos 500 µL de ácido tricloro acético a 20% e centrifugou-se novamente os tubos por 3 minutos a 15.000 g. Os sobrenadantes foram novamente descartados e o excesso de dinitro fenil hidrazina foi removido, lavando-se os pellets com 1 ml de etanol: etil acetato na proporção de 1:1 v/v. A solução de etanol: etil acetato foi adicionada aos tubos e estes misturados vigorosamente. Os tubos foram, então, centrifugados por 5 minutos a 15.000 g, sendo esse processo repetido três vezes. Aos pellets “lavados” foram adicionados 6 M de cloreto de guanidina e incubados a 37°C por 15 minutos. As leituras foram feitas em espectrofotômetro, escolhendo-se a absorvância máxima entre 360-370 nm. Os brancos foram preparados substituindo-se o 2,4 dinitrofenil hidrazina por HCl 2 M.

#### **6.2.9. Avaliação de Estresse oxidativo através do método de TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico)**

Este teste avalia a quantidade de malondialdeído (MDA), um bioproduto da peroxidação lipídica, que reage com ácido tiobarbitúrico (TBA) e resulta em um composto chamado de substâncias reativas de oxigênio (TBARS), que pode ser determinado por leitura em espectrofluorímetro, sendo os resultados apresentados em quantidade de MDA em  $\mu\text{M}/10^5$  células.

Para a leitura de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), adaptou-se a técnica descrita por Wasowic et al. (1993). Do sêmen descongelado foram retirados 50 µl e adicionados a 1 ml de água milli-q e 1 ml de solução de TBA (29mmol/L) dissolvida em ácido acético (8,75mol/L). Após homogeneizadas, as amostras foram aquecidas por uma hora em água à 100 °C e depois retiradas para esfriar em temperatura ambiente. Logo após, adicionou-se 50 µl de HCl (2,5

mmol/L) e 3,5 ml de ácido butílico. As amostras, então, foram homogeneizadas em vortex e centrifugadas durante 10 minutos a 15.000 g. A fase orgânica foi removida e colocada em cubetas de vidro para leitura em espectrofluorímetro, em uma excitação de 525 nm e emissão de 547nm. A curva de calibração foi preparada com padrões de MDA por  $\mu\text{M}$  de amostra/ $10^5$  de células.

### **6.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Para a realização das análises estatísticas utilizou-se o procedimento GLM (análise de variância) considerando os efeitos dos tratamentos, partidas, ganhões e as interações entre eles. Quando algum efeito foi observado utilizou-se a comparação de médias pelo teste de Tukey. Para as análises, utilizou-se o Statistical Analysis System – SAS (SAS, 1999), considerando nível de significância de  $P < 0,05$ .

### **6.4. RESULTADOS**

Para todas as variáveis estudadas, não foram observadas interações entre ganhão x tratamento e partida x tratamento ( $p > 0,05$ ).

A percentagem de espermatozóides móveis e vigor após criopreservação, não foram diferentes entre partidas ( $p > 0,05$ ). No entanto, o tratamento influenciou ( $p < 0,05$ ) ambos os parâmetros. A percentagem de espermatozóides móveis foi superior no grupo controle (66,9%) e tratamento com 5% de plasma seminal (61,9%), quando comparadas com 25% de plasma seminal (42,8%). A menor percentagem de motilidade foi obtida em espermatozóides congelados com 50% de plasma seminal (14,7%) (tabela 1). O mesmo padrão foi observado no parâmetro vigor, no qual o tratamento com 50% de plasma apresentou o valor mais baixo ( $p > 0,05$ ) quando comparado aos demais tratamentos (tabela 1).

A percentagem de espermatozóides morfologicamente normais e com cromatina íntegra foi semelhante ( $p > 0,05$ ) entre tratamentos (tabela 1).

A percentagem de espermatozóides vivos com acrossoma intacto (tabela 1)

foi menor ( $p < 0,05$ ) no tratamento com 50% de plasma seminal em comparação aos demais tratamentos e controle, e a percentagem de vivos com acrossoma reagido (tabela 2) apresentou médias menores ( $p < 0,05$ ) no tratamento com 25 e 50% de plasma seminal quando comparado com controle e tratamentos com 5% de plasma.

Na avaliação de integridade de membrana, não foram observadas diferenças na percentagem de espermatozoides íntegros e lesados entre partidas ( $p > 0,05$ ). No entanto, a percentagem dos mesmos diferiu ( $p < 0,05$ ) entre ganhões e entre tratamentos ( $p < 0,05$ ). O controle e o tratamento com 5% de plasma seminal apresentaram maior percentagem de íntegros e menor número de lesados, quando comparados com os resultados obtidos no tratamento com 50% de plasma seminal (tabela 3). O tratamento com 25% de plasma seminal não diferenciou ( $p > 0,05$ ) dos demais tratamentos e controle.

Na avaliação de peroxidação lipídica, diferenças entre ganhões não foram observadas ( $p > 0,05$ ). No entanto, as diferenças entre o controle e os tratamentos foram significativas ( $p < 0,05$ ). O controle apresentou maior peroxidação lipídica quando comparado aos demais tratamentos (tabela 4). Apesar dos tratamentos com plasma seminal não diferirem entre si ( $p > 0,05$ ), pode-se notar que ocorreu uma diminuição gradativa nesse parâmetro com o aumento na concentração de plasma (figura 1).

Na avaliação de quantidade de proteína, diferenças entre ganhões, partidas e tratamentos não foram observadas ( $p > 0,05$ ) (tabela 4 e figura 2).

## **6.5. DISCUSSÃO**

Existem controvérsias a respeito do uso do plasma seminal no processo de criopreservação. Amann & Pickett (1987) demonstraram que a remoção de plasma seminal antes da criopreservação previne o declínio da motilidade. No entanto, em um estudo mais recente não foi observado queda da motilidade quando espermatozoides foram criopreservados com mais de 80% de plasma seminal (Moore et al., 2005). Vários estudos apontam efeitos benéficos do plasma seminal durante a criopreservação (Aurich et al., 1996; Katila et al., 2002), entretanto os resultados não são comparáveis devido a diferenças nas metodologias utilizadas.

Já é comprovado que a criopreservação afeta a motilidade, entretanto, neste estudo as elevadas percentagens de motilidade pós-descongelamento sugerem que os ganhões utilizados possuem sêmen de boa congelabilidade e que no caso desses animais, o plasma deve possuir um efeito de supressão, já que os tratamentos com 25% e 50% reduziram consideravelmente a quantidade de espermatozoides móveis quando comparado com o controle e tratamento com 5% de plasma seminal (tabela 1). Para a característica vigor, também se observou um efeito de supressão no tratamento com 50% de plasma seminal. Estes resultados estão de acordo com resultados encontrados por Pickett et al. (1975), que afirmaram que alta concentração de plasma seminal é deletério às células espermáticas submetidas a resfriamento e armazenamento. Fatores no plasma seminal que possam afetar diretamente a motilidade dos espermatozoides ainda não foram identificados. Um estudo realizado por Baas e colaboradores (1983) evidenciou que uma fração com alto peso molecular no plasma seminal reduziu a motilidade de espermatozoides bovinos. Com isso acredita-se que possam existir fatores redutores de motilidade no plasma seminal equino e que esses fatores possam variar individualmente.

A reação acrossômica (RA) é um evento irreversível que, sob condições fisiológicas, é induzida pela ligação do espermatozoide com a zona pelúcida e só ocorre após a capacitação. Durante a RA, a membrana plasmática se funde com a membrana externa em vários locais da porção anterior da cabeça do espermatozoide. Isto resulta em liberação do conteúdo do acrossoma (na maior parte, enzimas) que promovem digestão e penetração na zona pelúcida. Essas alterações são de grande importância, já que reduzem a longevidade do espermatozoide criopreservado e parecem estar relacionadas com a baixa fertilidade do mesmo (Sion et al., 2004). Em um estudo realizado por Schembri e colaboradores (2002) utilizando a técnica de fluorescência de clortetraciclina (CTC), foi demonstrado que ejaculados frescos de ganhões apresentavam a maioria dos espermatozoides não-capacitados (93,6%) e baixa percentagem de capacitados (5,4%) e acrossoma-reagidos (1%). Entretanto, após criopreservação em meio de Kenney modificado (meio descrito por Kenney et al., 1975, sem bicarbonato de sódio e sulfato de gentamicina), observou-se um aumento na proporção de



espermatozoides capacitados (64,8%;  $p < 0.001$ ) e acrossoma-reagidos (32,8%;  $p < 0.001$ ) e uma diminuição na proporção de espermatozoides não-capacitados (2,5%;  $p < 0.001$ ). No mesmo trabalho, observou-se que uma maior diminuição na proporção de espermatozoides não-capacitados e maior aumento de capacitados ocorreu após centrifugação e remoção do plasma seminal e ressuspensão em meio de congelamento. Centrifugação e ressuspensão com plasma seminal homólogo não induziu capacitação. Em nossos estudos, um dos objetivos de manter o plasma seminal durante a criopreservação era observar se a adição do mesmo reduziria a quantidade de espermatozoides com acrossoma-reagidos utilizando a técnica Trypan Blue e Giemsa. Ao contrário do esperado, a adição de plasma seminal reduziu a percentagem de espermatozoides vivos com acrossoma intacto, quando o plasma foi adicionado na proporção de 50% (tabela 2). A quantidade de espermatozoides vivos avaliados nesta técnica seguiu os padrões de motilidade, ou seja, maiores concentrações de plasma seminal reduziram a quantidade de células vivas. A percentagem de mortos com acrossoma intacto permaneceu a mesma em todos os tratamentos e a percentagem de mortos com acrossoma reagido (reação acrossômica falsa) foi maior nas concentrações de 25% e 50% de plasma seminal. Tal fato pode explicar a menor quantidade de células vivas reagidas e intactas nos tratamentos com 25 e 50% de plasma seminal. Nesta reação de acrossoma falsa, o espermatozoide morre e depois reage, portanto, não se pode confirmar que as maiores concentrações de plasma seminal foram responsáveis pelas reações de acrossoma. O mais provável é que a maioria das reações aconteceram depois dos espermatozoides estarem mortos.

Dos resultados da avaliação de integridade de membrana plasmática (MP), verificou-se que o número médio de espermatozoides com MP íntegra também acompanhou os padrões de queda da motilidade à medida que se aumentou as concentrações de plasma seminal (tabela 1). Em estudos realizados por Harkema & Boyle (1992) valores próximos para percentuais de células móveis ( $41 \pm 7\%$ ) e íntegras ( $49 \pm 5\%$ ), pós-descongelamento em sêmen eqüino, foram obtidos. O presente trabalho, no entanto, observou diferença considerável em relação a esses dados. Para a motilidade pós-descongelamento dos ganhões avaliados no controle e

tratamentos, a porcentagem de íntegros foi menos que a metade das células móveis (tabela 1). Tais resultados sugerem que durante a criopreservação, as membranas dos espermatozóides são submetidas a uma variedade de condições desfavoráveis que afetam a membrana muito antes de afetar a capacidade de se movimentar. Os efeitos do plasma seminal na integridade de membrana, onde as concentrações 50% de plasma seminal diminuíram a porcentagem de células com membrana íntegra e aumentaram a porcentagem de células com membrana lesada (tabela 3), sugerem que a interação entre a membrana plasmática do espermatozóide e alguns componentes específicos do plasma seminal podem ser responsáveis pela susceptibilidade aos danos na membrana, tornando grandes concentrações do mesmo deletérias para sua integridade. A influência do plasma seminal na susceptibilidade individual de gametócitos durante criopreservação foi demonstrado por Aurich e colaboradores (1996).

Deve-se destacar, porém, que neste trabalho, à medida que se acrescentou plasma seminal, a concentração de crioprotetor não foi corrigida, sendo portanto, diluída até 2,5% no tratamento de 50% de plasma seminal. Tal fato nos leva a suspeitar que esta menor concentração de crioprotetor pode ser responsável pelos piores resultados obtidos na motilidade, integridade de membrana e integridade de acrossoma (tabela 1), ao contrário da hipótese levantada de efeito deletério do plasma seminal. No entanto, no trabalho realizado por Vidament et al. (2002), os mesmos avaliaram o efeito de concentrações crescentes de glicerol e dimetil-formamida sobre a motilidade e capacidade de fertilização do espermatozóide eqüino e observaram que a dimetil-formamida a 2% foi tão eficiente quanto o glicerol (2% e 3%) em manter a motilidade e capacidade de fertilização. No presente trabalho, a concentração mínima de dimetil-formamida, foi de 2,5%, uma concentração aceitável quando comparada com as concentrações utilizadas por Vidament et al. (2002). Outros trabalhos devem ser realizados no sentido de avaliar diferentes concentrações da dimetil-formamida para que se possa avaliar a concentração adequada e, também, sugere-se a realização de um trabalho semelhante a este no qual se realize o ajuste do crioprotetor para que se possa comprovar o efeito deletério do plasma seminal.

Quanto ao DNA, Baumber et al. (2003) relataram que a criopreservação é prejudicial à sua integridade. No mesmo estudo, a criopreservação de espermatozóide eqüino foi associada com um aumento na fragmentação do DNA quando comparado com sêmen fresco. Muitos estudos têm relacionado danos no DNA de espermatozóide humano com peroxidação lipídica (Chen et al, 1997; Twigg et al., 1998, Potts et al., 2000) e estresse oxidativo (Hugues et al., 1996; Aitken et al, 1998, Twigg et al, 1998; Donnelly et al, 1999). Embora a adição de plasma seminal tenha demonstrado efeito benéfico na proteção contra a peroxidação lipídica, efeitos na proteção contra danos no DNA não foram observados e a quantidade de espermatozóides com DNA danificado foi reduzida (tabela 1). Deve-se destacar, no entanto, que o teste de *orange acridine* utilizado é uma técnica que mede a susceptibilidade do DNA espermático a uma desnaturação ácido-induzida (Evenson et al., 2002), e pode não ser uma técnica adequada para identificar danos no DNA causados por peroxidação lipídica e estresse oxidativo, já que estes danos ocorrem na fragmentação do mesmo (Baumber et al., 2003). Para identificação de fragmentação de DNA, Eirenpreiss et al. (2006) sugeriram as técnicas de Tunel, Comet, avaliação de estabilidade nuclear e teste de dispersão de cromatina.

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a geração de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) pelos espermatozóides, que podem ser produzidas durante o metabolismo oxidativo, e o aumento de sua concentração pode ser devido à presença de espermatozóides anormais ou danificados. Ball et al. (2001) demonstraram que há um aumento de cinco vezes na produção de ROS após congelamento na espécie eqüina. O estresse oxidativo no sêmen ocorre como resultado de um desequilíbrio entre produção de ROS e sua capacidade antioxidante. Os espermatozóides são bastante suscetíveis a estresse oxidativo devido à grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes na sua membrana (Alvarez & Storey, 1992) e por seu citoplasma conter baixa concentração de enzimas antioxidantes (de Lamirande & Gagnon, 1995b; Sharma & Agarwal, 1996). Além disso, as enzimas intracelulares não podem proteger a membrana plasmática que envolve o acrossoma e a cauda, tornando a proteção bastante dependente do plasma seminal (Iwasaki & Gagnon, 1992). Em nossos estudos, a

avaliação indireta de estresse oxidativo através da mensuração de TBARS (substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico) demonstrou efeito significativo dos tratamentos na proteção contra peroxidação lipídica (tabela 4). Quando comparados com o controle, os tratamentos apresentaram maior proteção contra a peroxidação lipídica. Embora não se tenha observado diferenças significativas dos tratamentos entre si, observou-se uma tendência de aumento de proteção contra peroxidação lipídica quando maiores quantidades de plasma foram adicionadas (Figura 1). É possível que a não observação de diferenças significativas entre tratamentos se deva à grande variação entre partidas de um mesmo animal. Os resultados obtidos demonstram o efeito antioxidante do plasma seminal durante o processo de criopreservação. Catalase, superóxido dismutase (SOD) e sistema glutadiona peroxidase/ redutase e (GPx/ GRD) são as principais enzimas com ação antioxidante presentes no sêmen. O sêmen eqüino possui uma atividade de catalase; no entanto, a maior parte desta atividade se deve ao plasma seminal (Ball et al, 2000). Portanto, parece existir altos níveis de ambos SOD e GPx em plasma seminal eqüino. A alta concentração de enzimas antioxidantes no plasma é igualmente importante para a prevenção de danos aos espermatozóides. A remoção do plasma seminal durante um processo de criopreservação, portanto, diminui a capacidade de ação contra os efeitos de ROS devido ao limitado volume citoplasmático, além da remover enzimas antioxidantes presentes no plasma.

A proteína é outro tipo de molécula biológica que pode ser altamente danificada por ROS. Proteínas modificadas por estresse oxidativo têm sido relacionadas com uma variedade de processos fisiológicos e patológicos no organismo (Stadtman, 1986). Estudos realizados por Ciolino & Levine (1997) demonstraram que as proteínas são possivelmente oxidadas antes da diminuição de ATP celular e sua subsequente morte. O acúmulo de proteínas modificadas por estresse oxidativo causa alterações nas funções celulares através da perda da integridade estrutural e catalítica ou por interrupção de mecanismos regulatórios. No entanto, seus efeitos nos espermatozóides continuam desconhecidos e precisam ser estudados. Para identificação de proteínas oxidadas, métodos de identificação de grupos carbonil têm sido bastante utilizados em vários tipos de tecidos. Os

derivados do carbonil são os produtos mais relevantes resultantes do ataque dos radicais livres às proteínas. O 2,4 dinitrofenil hidrazina (DNPH) é um reagente que se liga ao grupo carbonil e se transforma em uma molécula estável chamada dinitrofenil hidrazona (DNP), podendo ser mensurado por espectrofotômetro (Dalle-Donne et al., 2003). A utilização de grupos carbonil como biomarcadores de estresse oxidativo possui algumas vantagens se comparado com outras técnicas de mensuração de produtos de oxidação devido a sua rápida formação e à relativa estabilidade das proteínas carboniladas (Dalle-Donne et al., 2003). No entanto, não existe na literatura trabalhos de mensuração de proteínas carboniladas em espermatozóide eqüino. Neste estudo, um protocolo já utilizado em tecidos de órgãos foi adaptado para avaliar o efeito do estresse oxidativo em proteínas de espermatozóide e não se observou efeito de proteção dos tratamentos com diferentes concentrações de plasma (tabela 4). Tais resultados sugerem que o plasma seminal é protetor eficaz contra peroxidação lipídica, no entanto, seu efeito na proteção contra oxidação de proteínas dos espermatozóides não foi evidente. Entretanto, deve-se ressaltar que houve uma grande variação nas amostras (figura 2), o que nos leva a suspeitar que a técnica não foi adaptada de forma adequada, ou que a mesma não é apropriada para espermatozóides eqüinos. Portanto, há necessidade de maiores estudos e comparações da técnica para que esta possa ser considerada confiável.

No presente trabalho, o plasma seminal foi adicionado com a intenção de proteger os espermatozóides eqüinos contra estresse oxidativo e danos subseqüentes. Apesar do plasma seminal proteger os espermatozóides contra peroxidação lipídica, este não demonstrou efeitos de proteção contra perda de viabilidade, tornando-se até prejudicial aos mesmos, quando colocado em 50% de concentração. Isto indica que, apesar do efeito antioxidante do plasma seminal, este possui componentes específicos que, em altas concentrações, podem ser responsáveis pela redução da viabilidade das células espermáticas durante a criopreservação. Deve-se destacar, também, que nas análises realizadas o efeito deletério da peroxidação lipídica não foi observado, o que sugere que a mesma possa não ser um grande problema dentro da criopreservação ou que seus danos

são causados a níveis subcelulares e não puderam ser detectados nas técnicas adotadas. Embora os resultados apontem para a retirada do plasma seminal para posterior criopreservação, outros estudos devem ser realizados utilizando menores concentrações de plasma seminal para que se possa aproveitar seus efeitos antioxidantes, sem prejudicar a célula. Além disso, as mesmas avaliações deveriam ser realizadas em diferentes períodos após descongelamento com objetivo de avaliar os efeitos do plasma na manutenção da viabilidade das células espermáticas. Outros estudos devem ser realizados, também, com objetivo de avaliar diferentes momentos de adição de plasma durante a criopreservação ou antes da inseminação. Sugere-se, também, que mais estudos de identificação e análise dos fatores antioxidantes presentes no plasma seminal sejam realizados com intuito de permitir a adição dos mesmos no diluente em substituição ao plasma, evitando seus efeitos deletérios.

Com base nos resultados, pode-se concluir que a adição de plasma seminal protege contra a peroxidação lipídica durante a criopreservação. Entretanto, quando utilizado em concentrações acima de 25%, evidencia uma redução na viabilidade do espermatozóide.

## 6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J.P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D.S. **Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa.** *Biol Reprod* 1998;59(5);1037-1046.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; ET AL. **The plasma membrane.** *In:\_\_\_ Molecular biology of the cell. 2. ed. New York: Garland Publishing cap. 6.* 1989;p.275-340.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. **Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation.** *J Androl* 1992;13;232-241.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. **Principles of cryopreservation of stallion spermatozoa.** *Equine Vet Sci* 1987;7;145-73.

AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. **Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation.** *Theriogenology* 1996;46;791-797.

BAAS, J.W.; MOLAN, P.C.; SHANNON, P. **Factors in seminal plasma that affect the viability and motility of spermatozoa.** *J Reprod Fertil* 1983; 68:275-280.

BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; BAUMBER, J.; LIU, I.K. **Catalase activity in equine semen.** *Am J Vet Res* 2000;61(9);1026-1030.

BALL, B.A.; VO A.T.; BAUMBER, J. **Generation of reactive oxygen species by**

**equine spermatozoa.** *Am J Vet Res* 2001:62(4); 508-515.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C. **The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation.** *J Androl* 2000:21(6);895-902.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. **Reactive Oxygen Species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa.** *J Androl* 2003:24(4);621-628.

BEDFORD, S.J.; MEYERS, S.A.; VARNER, D.D. **Acrosomal status of fresh, cooled and cryopreserved stallion spermatozoa.** *J Reprod Fertil* 2000:56(suppl.);133-40.

CHEN, C.S.; CHAO, H.T.; PAN, R.L.; WEI, Y.H. **Hydroxyl radical-induced decline in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm.** *Biochem Mol Biol Int* 1997:43(2); 291-303.

CIOLINO, H.P.; LEVINE, R.L. **Modification of proteins in endothelial cell death during oxidative stress.** *Free Radic Biol Med* 1997:22(7);1277-1282.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2ed, Belo Horizonte, CBRA, 1998:49p.

CORMIER, N.; BAILEY, J.L. **A differential mechanism is involved during heparin-and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa.** *Biol Reprod* 2003:69(1);177-85.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. **Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress.** *Clin Chim Acta*,



2003:329(1-2); 23–38.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. **Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects.** *Hum Reprod* 1995a:10; 15-21.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. **Capacitation-associated production of superoxide anion human spermatozoa.** *Free Radic Biol Med* 1995b:18(3);487-495.

DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J.R.; GRAVES, C.N. **Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species.** *Gamet Res.*, 1989:22(1);51-57.

DONELLY, 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* 1999:14(5);505-512.

ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. **Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects.** *Asian J Androl* 2006;8(1):11–29

EVENSON, D.P.; LARSON, L.L.; JOST, L.K. **Sperm chromatin Structure Assay: Its clinical use for detecting sperm fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques.** *J Androl* 2002;23(1):25-43.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. **Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed.** *Theriogenology* 2002:58;277-279.

GREEN, C.E.; WATSON, P.F. **Comparison of the capacitaion-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation.** *Reproduction* 2001:122(6);889-898.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Papel de antioxidants na andrologia (Revisão de Literatura).** *Rev Bras Reprod Anim* 2004:28(4);187-195.

HARKEMA, W.; BOYLE, MS. **Use of fluorescent stains to assess membrane integrity of equine spermatozoa.** *In: International Congress of Animal Reproduction, 12, Proceedings...*1992.p.1424-6

HUGUES, C.M.; LEWIS, S.E.; MCKELVEY-MARTIN, V.J. **Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using modified comet assay.** *Mol Human Reprod.* 1996:2;613-619.

IWASAKI, A.; GAGNON, C. **Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients.** *Fertil Steril* 1992:57(2);409-16.

KATILA, T.; ANDERSON, M.; REILAS, T.; KOSKINEN, E. **Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates.** *Theriogenology* 2002:58;241-244.

KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W.L.; and MORSE, G. W. **Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings.** *Proc Annu Conv Am Assoc Eq Pract* 1975:21,327-36.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. **Cryopreservation of stallion sperm using different amides.** *Theriogenology* 2002:58;273-276.

MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. **Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa.** *Theriogenology* 2005;63;2372-2381.

MORRIS, L.H.; TIPLADY, C.; ALLEN, WR. **Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction.** *Equine Vet J* 2003;35(2);197-201.

NEILD, D.M.; GADELLA, B.M.; CHAVES, M.G.; MIRAGAYA, M.H.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A. **Membrane changes during different stages of freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation.** *Theriogenology* 2003;59(8);1693-1705.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. **Effect of bovine sperm separation by either swim up and percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development.** *Theriogenology* 1995;44:859-869.

PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W.; PACE, M.M.; REMMENGA, E.E. **Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa.** *Fertil Steril* 1975;26(2);167-174.

POTTS, R.J.; NOTARIANNI, L.J.; JEFFERIES, T.M. **Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation.** *Mutat Res* 2000;447(2);249-256.

RAMOS-VASCONCELOS, G.R.; HERMES-LIMA, M. **Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*.** *J Exp Biol* 2003;206(Pt 4):675-685.

SAS **Statistical Analysis System**, User's Guide, Caru Indiana, 1999, 295p.

SCHEMBRI, M.A.; MAJOR, D.A.; SUTTIE, J.J.; MAXWELL, W.M.; EVANS G. **Capacitation—like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process.** *Reprod Fertil Dev* 2002;14(3-4);225-233.

SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. **Role of reactive oxygen species in male infertility (review).** *Urology* 1996;48(6); 835-850.

SION, B.; JANNY, L.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. **Annexin V binding to plasma membrane predicts the quality of human spermatozoa.** *Int J Androl* 2004;27(2):108-114.

STADTMAN, E.R. **Trends** *Biol Sci* 1986;11; 11-12.

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S.A. **A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence.** *Fertile Steril* 1984;42:87-91.

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

VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P.; BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. **Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide.** *Theriogenology* 2002;58:249-251.

WASOWICZ, W.; NÉVE, J.; PERETZ, A. **Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage.** *Clin Chem*

1993;39(12):2522-2526.

WATSON, P.F. **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.** *Anim Reprod Sci* 2000: 60-61;481-492.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina.** *Tese de doutorado apresentada em Botucatu, SP,* 1998.

**Tabela 1 - Médias ( $\pm$  desvio-padrão) da motilidade (%), vigor (0-5), percentagem (%) de células espermáticas morfologicamente normais (N), com membrana plasmática íntegra (MPI), com cromatina íntegra (CI), e vivas com acrossoma íntegro (AI) em diferentes concentrações de plasma seminal (PS) no sêmen equino criopreservado.**

<b>Tratamento</b>	<b>Motilidade (%)</b>	<b>Vigor (0-5)</b>	<b>Células N (%)</b>	<b>Células CI (%)</b>	<b>Células MPI (%)</b>	<b>Células vivas AI (%)</b>
<b>Controle</b>	66.9 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>	2.3 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	69.5 $\pm$ 9.4 <sup>a</sup>	97.5 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	22.02 $\pm$ 11.19 <sup>a</sup>	23.96 $\pm$ 13.5 <sup>a</sup>
<b>5% de PS</b>	61.9 $\pm$ 12.6 <sup>a</sup>	2.3 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	75.6 $\pm$ 11.1 <sup>a</sup>	98 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	18.98 $\pm$ 12.14 <sup>a</sup>	22.1 $\pm$ 11.4 <sup>a</sup>
<b>25% de PS</b>	42.8 $\pm$ 12 <sup>b</sup>	1.8 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	78.1 $\pm$ 8.3 <sup>a</sup>	97.8 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>	13.72 $\pm$ 11.13 <sup>a, b</sup>	14.8 $\pm$ 9.8 <sup>a, b</sup>
<b>50% de PS</b>	14.7 $\pm$ 9.6 <sup>c</sup>	1.0 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	75.4 $\pm$ 9.6 <sup>a</sup>	97.9 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	4.22 $\pm$ 5.68 <sup>b</sup>	6.9 $\pm$ 6.5 <sup>b</sup>

<sup>a, b, c</sup> Médias, dentro da mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2 - Médias ( $\pm$  desvio padrão) das percentagens de espermatozóides vivos com acrossomas intactos e reagidos e espermatozóides mortos com acrossomas intactos e reagidos em controle e diferentes concentrações de plasma seminal (PS) no sêmen eqüino criopreservado.**

<b>Tratamento</b>	<b>Vivos intactos (%)</b>	<b>Vivos reagidos (%)</b>	<b>Mortos intactos (%)</b>	<b>Mortos reagidos (%)</b>
Controle	23.96 $\pm$ 13.5 <sup>a</sup>	7.2 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	24.6 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	44.2 $\pm$ 14.4 <sup>a</sup>
5% de PS	22.1 $\pm$ 11.4 <sup>a</sup>	9.0 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>	24.8 $\pm$ 7.8 <sup>a</sup>	44.1 $\pm$ 13.9 <sup>a</sup>
25% de PS	14.8 $\pm$ 9.8 <sup>a,b</sup>	3.9 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>	27.1 $\pm$ 10.9 <sup>a</sup>	53.95 $\pm$ 16.2 <sup>a,b</sup>
50% de PS	6.9 $\pm$ 6.5 <sup>b</sup>	2.3 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	26.6 $\pm$ 12.1 <sup>a</sup>	64.2 $\pm$ 14.3 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Médias, dentro da mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 3 - Média ( $\pm$  desvio padrão) da porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e lesada no controle e tratamentos com diferentes concentrações de plasma seminal (PS) no sêmen eqüino criopreservado.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Íntegros</b>	<b>Lesados</b>
Controle	22.02 $\pm$ 11.19 <sup>a</sup>	77.98 $\pm$ 11.18 <sup>a</sup>
5% de PS	18.98 $\pm$ 12.14 <sup>a</sup>	81.02 $\pm$ 12.14 <sup>a</sup>
25% de PS	13.72 $\pm$ 11.13 <sup>b</sup>	86.28 $\pm$ 11.13 <sup>a</sup>
50% de PS	4.22 $\pm$ 5.68 <sup>b</sup>	95.76 $\pm$ 5.68 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Médias, dentro da mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

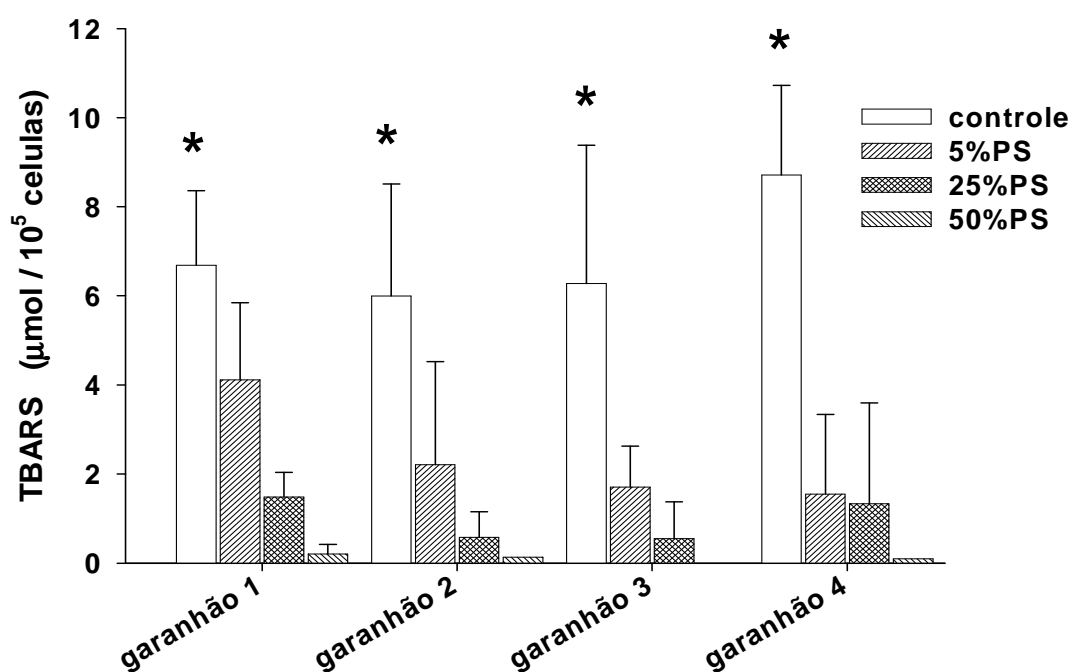
**Tabela 4 – Média (desvio padrão) de peroxidação lipídica avaliada pela concentração de malondialdeído (MDA) e concentração de proteínas carboniladas lidas por nm de amostra no controle e diferentes concentrações de plasma seminal (PS) no sêmen eqüino criopreservado.**

<b>Tratamentos</b>	<b>Peroxidação Lipídica</b>	<b>Proteínas Carboniladas</b>
Controle	6.7 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	95 $\pm$ 112.4 <sup>a</sup>
5% de PS	2.4 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	68.1 $\pm$ 82.9 <sup>a</sup>
25% de PS	1.3 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	90.4 $\pm$ 87.9 <sup>a</sup>
50% de PS	0.25 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	87.7 $\pm$ 78.1 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias, dentro da mesma coluna, seguidas da mesma letra, não diferem entre si ( $p>0,05$ ).



Almeida *et al.*, 2006 - Figura 1



(\*) estatisticamente diferente (p<0.05)

**Figura 1: Peroxidação lipídica medida através da leitura da concentração de MDA por μMol de amostra em controle e diferentes concentrações de plasma seminal de sêmen criopreservado de quatro garanhões.**

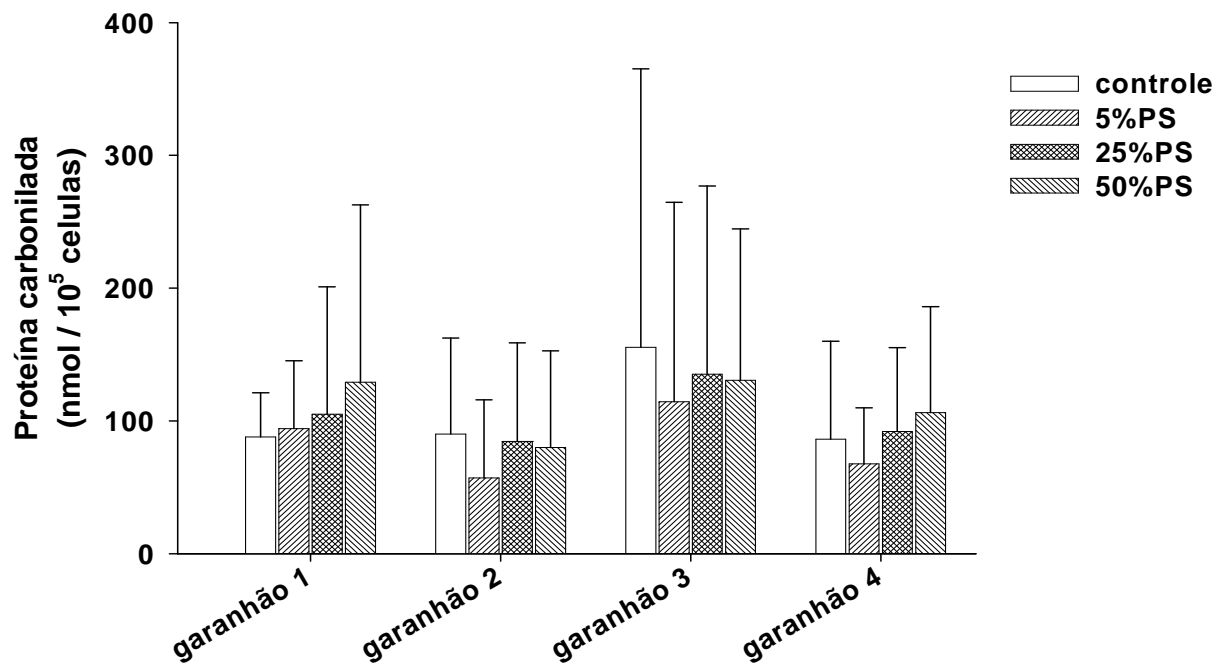


Figura 2: Concentração de proteínas carboniladas em controle e diferentes concentrações de plasma seminal de sêmen criopreservado de quatro garanhões.