

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

ESTRESSE OXIDATIVO NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO

**IVAN CUNHA BUSTAMANTE FILHO
Médico Veterinário/UENF**

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia
Área de Concentração Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2006

Nascer, crescer, reproduzir, envelhecer... Evoluir.

A vida e a morte: uma experiência oxidativa.

DEDICO

Aos meus pais e irmãs, que proveram os bens mais preciosos: família e educação.

À Ana, que há cinco anos ilumina meu caminho de longe ou de perto, transformando, com amor, tudo mais simples.

AGRADECIMENTOS

À Professora Maria Inês Mascarenhas Jobim, pela competente orientação e amizade.

Ao Professor Carlos Severo Dutra Filho, que abriu as portas do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo, onde foram realizados os ensaios bioquímicos. Obrigado pela valiosa co-orientação neste trabalho.

À Cabanha Maufer, à Cabanha Don Marcelino e aos médicos veterinários Frederico e Gustavo, que viabilizaram os animais para este estudo.

À Professora Enefer Rosana Oberst e demais colegas do Laboratório de Inseminação Artificial (FAVET - UFRGS), em especial à Dayana e Martha.

À Carolina, Ângela, Mirian e demais colegas dos laboratórios 34, 36 e 38 (Depto. Bioquímica, ICBS – UFRGS), que de forma sempre solícita e paciente, me ajudaram com as minhas “amostras”.

Aos novos amigos, Rodrigo, Emílio, Zé, Jú, Maria Helena, Lúcia... são tantos... que este seja só o começo de uma longa amizade.

À Professora Vera Wald, pela colaboração na análise estatística.

Ao Professor Rodrigo, Cristina, Ênio e Adriana, pela amizade e pelas inúmeras contribuições ao trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Propesq/UFRGS e CAPES, por terem viabilizado e financiado este projeto.

ESTRESSE OXIDATIVO NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO¹

Autor: Ivan Cunha Bustamante Filho

Orientadora: Prof^a. Maria Inês Mascarenhas Jobim

Co-orientador: Prof. Carlos Severo Dutra Filho

A criopreservação de sêmen é um processo de grande estresse celular, que impõe aos espermatozoides condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade. Diversos estudos propõem que a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e a perda da capacidade antioxidante do sêmen potencializam os efeitos prejudiciais dessa biotécnica. O objetivo do presente estudo foi avaliar as atividades antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas e a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), como indicador de lipoperoxidação do sêmen equino, durante a criopreservação. Quinze ejaculados de seis garanhões comprovadamente férteis da raça Crioula, foram submetidos a criopreservação, utilizando-se diluente comercial à base de citrato-Hepes, gema de ovo e leite. Foram avaliadas as atividades das enzimas catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase; o potencial antioxidante total e a concentração de TBA-RS no sêmen fresco, diluído e congelado. Uma maior atividade das três enzimas estudadas foi observada no sêmen fresco em relação ao sêmen diluído e congelado ($p < 0,0001$), não havendo diferença entre os dois últimos ($p > 0,05$). Não houve diferença na atividade antioxidante não enzimática nas três fases estudadas ($p > 0,05$). Não foi observada nenhuma associação tanto das defesas antioxidantes enzimáticas como das não enzimáticas com a qualidade do sêmen congelado. A queda na motilidade do sêmen congelado pode ser parcialmente explicada pelo aumento da peroxidação dos lipídios do sêmen.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, (78. p). Fevereiro de 2006.

OXIDATIVE STRESS IN EQUINE SEMEN CRYOPRESERVATION ¹

Author: Ivan Cunha Bustamante Filho

Advisor: Prof^a. Maria Inês Mascarenhas Jobim

Co-Advisor: Prof. Carlos Severo Dutra Filho

Semen cryopreservation is a stressful procedure which exposes spermatozoa to harmful conditions leading to reduced cell viability. Several studies propose that reactive oxygen species overproduction and decreased antioxidant capacity of semen may increase the damaging effects of the technique. The aim of this work was to evaluate the enzymatic and non-enzymatic antioxidant activity, as well as the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) as and indicator of lipid peroxidation on equine semen during cryopreservation. Fifteen ejaculates from six fertile Criollo stallions were cryopreserved using a commercial extender (citrate-Hepes, egg yolk and skim milk). Activity of catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase; the total radical-trapping antioxidant potential and TBA-RS content was assessed in native semen, semen diluted in semen extender and thawed semen. All three enzymes showed higher activities in native semen than in diluted and thawed semen ($p < 0,0001$). No difference was observed between diluted and thawed semen ($p > 0,05$). The non-enzymatic defenses did not differ along cryopreservation process ($p > 0,05$). There was not any association between semen quality and both enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses. The decreasing of spermatozoa motility might be partially explained by the increase in semen lipoperoxidation.

¹ Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, (78 p.). February, 2006.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 O Espermatozóide.....	4
2.2 O plasma seminal.....	7
2.3 Criopreservação do sêmen eqüino.....	8
2.3.1 Influência do garanhão e ejaculado.....	11
2.4 Radicais livres.....	12
2.4.1 Estresse oxidativo.....	14
2.4.2 Defesas antioxidantes.....	17
2.4.2.1 Enzimas antioxidantes.....	18
2.4.2.1.1 Superóxido Dismutase (SOD).....	18
2.4.2.1.2 Catalase (CAT).....	19
2.4.2.1.3 Glutaciona Peroxidase (GPx).....	20
2.4.2.2 Antioxidantes não enzimáticos.....	20
2.4.2.2.1 Ácido Ascórbico.....	21
2.4.2.2.2 α -Tocoferol (Vitamina E).....	21
2.4.2.2.3 Glutaciona (GSH).....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Materiais.....	23
3.2 Local de execução.....	23
3.3 Animais.....	23
3.4 Coleta do sêmen.....	24
3.5 Exame do sêmen.....	24
3.5.1 Exame macroscópico do sêmen.....	24
3.5.2 Motilidade espermática.....	25
3.5.3 Determinação da concentração espermática.....	25
3.5.4 Integridade física da membrana.....	26
3.5.5 Integridade funcional da membrana.....	27
3.6 Criopreservação de sêmen.....	27
3.7 Ensaios bioquímicos.....	30
3.7.1 Preparo das amostras.....	30
3.7.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	30
3.7.3 Atividade da catalase (CAT).....	31
3.7.4 Atividade da glutaciona peroxidase (GPx).....	31
3.7.5 Capacidade antioxidante total (TRAP).....	31
3.7.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	32
3.7.7 Dosagem de proteína na amostra.....	33
3.8 Delineamento experimental e análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	34

4.1 Exame do sêmen.....	34
4.2 Atividade da enzima superóxido dismutase.....	37
4.3 Atividade da enzima catalase.....	38
4.4 Atividade da enzima glutationala peroxidase.....	39
4.5 Capacidade antioxidante total (TRAP).....	40
4.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	42
4.7 Correlações.....	44
5. DISCUSSÃO.....	46
5.1 Características do sêmen.....	46
5.2 Atividade dos antioxidantes enzimáticos.....	49
5.3 Atividade antioxidante não enzimática.....	51
5.4 Lipoperoxidação.....	54
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
APÊNDICE	68
VITA.....	75

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Composição dos diluentes utilizados na criopreservação do sêmen eqüino.....	28
2. Valores da média e do desvio padrão das características macro e microscópicas dos ejaculados dos seis garanhões.....	36

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Redução tetravalente do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água.....	13
2. Reação de dismutação do radical superóxido.....	19
3. Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) ao oxigênio no estado fundamental (O ₂).....	19
4. Reação de redução do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) à água (H ₂ O) com concomitante oxidação da glutathiona reduzida (GSH).....	20
5. Reação de redução de peróxidos a álcoois, catalisada pela GPx.....	20
6. Fluxograma do protocolo de criopreservação do sêmen eqüino e avaliação espermática.....	29
7. Valores da média e o desvio padrão da motilidade total e progressiva do sêmen eqüino fresco e congelado.....	34
8. Valores de média e do desvio padrão de espermatozóides com integridade física e funcional de membrana, do sêmen eqüino congelado.....	35
9. Valores da média e do desvio padrão do logaritmo da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no sêmen eqüino, fresco, diluído e congelado.....	37
10. Valores da média e do desvio padrão do logaritmo da atividade da catalase no sêmen eqüino, fresco, diluído e congelado.....	38
11. Valores da média e do desvio padrão do logaritmo da atividade da enzima catalase no sêmen fresco, diluído e congelado dos seis ganhões.....	39
12. Valores da média e do desvio padrão da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) no sêmen eqüino, fresco, diluído e congelado.....	40
13. Valores da média e do desvio padrão do potencial antioxidante total (TRAP) no sêmen eqüino, fresco, diluído e congelado.....	41
14. Valores da média e do desvio padrão do logaritmo do potencial antioxidante total (TRAP) no sêmen fresco, diluído e congelado dos seis ganhões.....	42

15. Valores da média e do desvio padrão do logaritmo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), no sêmen eqüino fresco, diluído e congelado.....	43
16. Valores da média e do desvio padrão do logaritmo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), no sêmen eqüino fresco, diluído e congelado.....	44
17. Efeito das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na motilidade total do sêmen congelado.....	45
18. Efeito das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na motilidade progressiva do sêmen congelado.....	45

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$^1\text{O}_2$	oxigênio <i>singlet</i>
ABAP	2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane)
CAT	catalase
CFDA	diacetato de carboxifluoresceína
DNA	ácido desoxirribonucléico
ERO	espécies reativas de oxigênio
GPx	glutaciona peroxidase
GR	glutaciona redutase
GS	glutaciona sintetase
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona oxidada
HO	teste hiposmótico
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
LOOH	hidroperóxido lipídico
$\text{O}_2^{\bullet-}$	radical superóxido
OH^{\bullet}	hidroxila
PI	iodeto de propídeo
ROO^{\bullet}	radical peroxila
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
SOD	superóxido dismutase
sptz	espermatozóide
TBA-RS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRAP	capacidade antioxidante total
λ	comprimento de onda

1. INTRODUÇÃO

O eqüino é a espécie animal que maior número de empregos gera mundialmente, pela tecnificação de sua criação e pelo alto valor agregado de seus produtos. As recentes conquistas brasileiras em pistas internacionais, tanto de corridas como no salto, tornaram o cavalo um produto de exportação, gerando divisas para o nosso país. (Lima, 2005)

Para manter a criação nacional e estadual competitiva é necessário, entre outras medidas, utilizar modernas biotécnicas para aprimorar a reprodução e diminuir os custos da produção.

A inseminação artificial (IA) é uma técnica largamente utilizada na reprodução eqüina. Sua utilização oferece várias vantagens sobre a monta natural, como a otimização do uso do garanhão por temporada de monta, aumentando sua eficiência reprodutiva, a diminuição dos riscos de acidentes durante a cobertura e a redução da transmissão de doenças venéreas (Samper, 2000).

Associando-se a técnica de IA com a utilização do sêmen criopreservado, estas vantagens são potencializadas. A possibilidade de armazenamento do sêmen por tempo ilimitado viabiliza o melhor

aproveitamento da genética dos garanhões e reduz custos de produção.

Todavia, a criopreservação do sêmen de garanhões ainda encontra diversas restrições, o que pode ser atribuído à redução da viabilidade celular e, conseqüentemente, à perda da capacidade fertilizante. Desta forma, para a obtenção de prenhez com sêmen eqüino congelado é necessário um rigoroso controle do crescimento folicular, inseminando-se a égua o mais próximo possível do momento da ovulação. Contudo, este procedimento é pouco pratico e oneroso, limitando o uso da técnica.

A obtenção de avanços na tecnologia de criopreservação de sêmen eqüino requer um maior conhecimento da fisiologia dos gametas e dos processos bioquímicos que ocorrem desde a coleta do ejaculado até a descongelação do sêmen.

Na última década, novas técnicas bioquímicas possibilitaram a investigação do estresse oxidativo no sêmen. Foi constatado que o espermatozóide eqüino produz, fisiologicamente, espécies reativas de oxigênio (ROS). Para garantir concentrações de ROS compatíveis com a viabilidade celular, tanto os espermatozoides quanto o plasma seminal possuem diversos mecanismos de defesa antioxidante (Ball et al., 2001). Entretanto, quando é estabelecido um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS, diversos danos oxidativos podem ocorrer na célula espermática como, por exemplo, alterações na fluidez da membrana plasmática, com conseqüente perda da motilidade e da capacidade fertilizante. Diversos trabalhos mostraram que a criopreservação do sêmen aumenta a produção de ROS, bem como diminui as defesas antioxidantes do sêmen (Ball et al., 2001; Agarwal & Said,

2005; Baumber et al., 2005).

O objetivo do presente trabalho foi contribuir para o conhecimento dos eventos e das alterações bioquímicas que ocorrem durante o processo de criopreservação do sêmen eqüino, mediante a avaliação das defesas antioxidantes do sêmen, em um protocolo de congelação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O espermatozóide

O espermatozóide é formado por duas regiões, cabeça e cauda, entretanto, funcionalmente podemos diferenciar outras regiões ou organelas altamente especializadas como: acrossomo, colo, axonema e membrana plasmática (Hafez, 1995).

A cabeça do espermatozóide eqüino é achatada e larga, resguardando em seu interior o núcleo da célula. Dentro do núcleo existem cromatina condensada, DNA e a protamina, principal proteína associada ao DNA espermático. A porção anterior do núcleo é envolta pelo acrossoma, uma vesícula especializada, formada por uma dupla membrana, que é constituído dos segmentos apical, principal e equatorial.

Durante a reação acrossômica, a membrana externa do acrossoma e a membrana plasmática fundem-se, sendo formadas vesículas; através dos espaços formados ocorre a exocitose do conteúdo acrossomal (Eddy, 1988). O segmento equatorial não contém enzimas; conseqüentemente, não está envolvido com a reação acrossômica, mas a membrana plasmática funde-se

com a membrana do oócito nesta área (Amman & Graham, 1992).

O acrossoma contém gicolipídios e enzimas, como a fosfolipase A, a pró-acrosina, a hialuronidase, as esterases e as hidrolases ácidas, envolvidas no processo da fertilização (Mann & Lutwak-Mann, 1981).

O flagelo ou cauda do espermatozóide mamífero é formado de quatro segmentos distintos: o colo, a peça intermediária, a peça principal e a peça final (Eddy, 1988). As principais estruturas do flagelo são o axonema ou filamento axial, a bainha de mitocôndrias e a bainha fibrosa externa. O filamento axial é composto de dois microtúbulos centrais circundados por nove microtúbulos duplos, que se estendem por todo o flagelo.

A peça intermediária é envolvida pela bainha de mitocôndrias, tendo a forma de espiral dupla, enquanto a peça principal contém a bainha fibrosa (Eddy, 1988). A bainha mitocondrial contém enzimas e co-fatores necessários para a produção de ATP (Amman & Graham, 1992). A peça terminal, posterior à membrana fibrosa, contém somente o axonema, recoberto pela membrana plasmática (Garner & Hafez, 1995).

As mitocôndrias de espermatozóides de espécies diferentes parecem ser semelhantes. Ao contrário da membrana externa da mitocôndria, as cristas desta organela demonstram maior susceptibilidade a danos quando o espermatozóide é submetido à criopreservação sem que ocorra uma desidratação mínima, ou na ausência de um agente crioprotetor intracelular como, por exemplo, o glicerol (Amman, 1991).

Da mesma forma, as proteínas do axonema são similares entre

muitas espécies. Essas proteínas e algumas presentes nas fibras externas densas e na bainha fibrosa normalmente respondem de maneira semelhante aos crioprotetores, mudança de temperatura, desidratação e fluxo de solvente. O axonema certamente é afetado pela criopreservação. Estudos detalhados estabeleceram que as proteínas dos microtúbulos alteram-se na presença de glicerol. Essas proteínas sofrem despolimerização e repolimerização durante a congelação-descongelação. Os espermatozóides submetidos à congelação mantêm a motilidade por um curto período depois de descongelados, quando comparados aos espermatozóides que não foram congelados. Esse fato pode ser explicado devido às alterações que o axonema sofre durante o processo e, mais ainda, às alterações mitocôndrias ou de membrana plasmática. (Amman, 1991).

O espermatozóide é recoberto pela membrana plasmática, uma dupla camada com porções hidrofílicas de lipídios e de proteínas; onde complexas interações entre eles regulam os receptores de membrana, os íons ou as enzimas, e conseqüentemente a função celular (Hammerstedt et al., 1990). Essa membrana plasmática está subdividida em regiões específicas, que diferem em sua composição e função. Moléculas envolvidas na reação acrossômica estão presentes na região anterior do acrossoma (Sailling, 1986); moléculas envolvidas na fusão oócito-espermatozóide são encontradas na região posterior do acrossoma (Sailling et al., 1985) e moléculas envolvidas com a atividade flagelar estão associadas com a membrana plasmática do flagelo (Kopf et al., 1986).

A composição da membrana plasmática dos espermatozóides de

diferentes espécies de mamíferos varia consideravelmente. Essa composição está relacionada com a habilidade do espermatozóide de suportar as alterações sofridas durante o processo de criopreservação (Amman, 1991). Por ser constituída em grande proporção por ácidos graxos polinsaturados, a membrana plasmática do espermatozóide é altamente vulnerável a danos oxidativos (Sharma & Agarwal, 1996).

2.2 O plasma seminal

O plasma seminal eqüino é composto pelas secreções do epidídimo, ampola do canal deferente, próstata, vesículas seminais e glândulas bulbo-uretrais (Mann, 1975; Varner et al., 1987). As secreções do trato reprodutivo do garanhão podem ser divididas em diferentes frações: pré-secreção, fração rica do ejaculado e fração pobre ou pós-espermática (Mann, 1975; Mann & Lutwak-Mann, 1981; Varner et al., 1987).

A pré-secreção provém das glândulas uretrais e bulbo-uretrais, é rica em cloreto de sódio e possui a função de limpeza da uretra.

A fração rica do ejaculado tem alta concentração de espermatozoides suspensos em secreções do epidídimo, ampolas do canal deferente e próstata (Mann & Lutwak-Mann, 1981).

As ampolas do canal deferente produzem a ergotioneína, que tem a função de proteger os espermatozoides contra agentes oxidantes e peroxidantes (Mann & Lutwak-Mann, 1981).

O epidídimo produz a glicerilfosforilcolina, que tem papel importante

no metabolismo dos lipídios e na maturação espermática (Magestrini et al., 1996), podendo ser utilizada como marcador da função secretora do epidídimo (Klug, 1982). De origem epididimária, ainda são encontrados no plasma seminal diversos agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Jervis & Robaire, 2001).

A fração pobre contém baixa concentração de espermatozóides (Keller et al., 2001), é composta por gel e é rica em ácido cítrico produzido pelas vesículas seminais (Kneissl, 1993).

O papel fisiológico do plasma seminal é contraditório. Por um lado, é importante na sobrevivência e na capacidade de fertilização do espermatozóide; por outro, o sêmen eqüino pode ser utilizado com apenas 2,5% do plasma seminal com sucesso em inseminação artificial (Schmitt, 2002). Diversos trabalhos em eqüinos indicam que altas concentrações de plasma seminal podem ter efeitos deletérios sobre a motilidade espermática após armazenamento por períodos prolongados (Pickett et al., 1975; Varner et al., 1987; Jasko, 1994, Magestrini et al., 1996).

A remoção do plasma seminal antes da congelação ajuda a manter a motilidade espermática pós-descongelação, porque as altas concentrações de cloreto de sódio presentes no líquido seminal causam danos aos espermatozóides criopreservados (Nishikawa, 1975). Para minimizar este efeito, uma diluição do sêmen 1:1 já é feita antes da centrifugação e da remoção do plasma seminal, sendo este procedimento necessário para prolongar a viabilidade espermática na criopreservação (Pickett et al., 1975; Martin et al., 1979).

2.3 Criopreservação do sêmen eqüino

Os primeiros resultados, obtidos na inseminação artificial com utilização de sêmen congelado foram alcançados por Polge & Rowson, em 1952. A partir desta data, a tecnologia da criopreservação tem apresentado um desenvolvimento notório: melhoramento na qualidade e na fertilidade do sêmen após o processamento. Apesar dos avanços tecnológicos, o uso da inseminação artificial na espécie eqüina ainda encontra barreiras no que se refere à congelação do sêmen. E desde o relato da primeira prenhez obtida com sêmen eqüino congelado (Barker & Gandier, 1957) até os dias de hoje não são obtidas taxas de prenhez satisfatórias.

Durante o processo de congelação ocorrem danos, provocados pelas baixas temperaturas a que são submetidos os espermatozóides: formação de cristais de gelo intracelulares, aumento da concentração intracelular de solutos e modificações correlacionadas, resultantes da desidratação celular. Lesões celulares podem ser causadas diretamente, afetando estruturalmente as organelas (ruptura de membranas), ou indiretamente, alterando as funções celulares através do processo metabólico (Holt, 2000).

Em condições de estresse, provocadas pela criopreservação, as membranas podem sofrer rearranjos, formando pontos vulneráveis e, com isso, induzir a excessiva permeabilidade ou mesmo o rompimento da membrana (Amman & Graham, 1992). Na membrana plasmática do espermatozóide, esse estresse está relacionado à fase de transição dos lipídios, a qual altera o estado funcional da membrana (Holt, 2000). Quando a temperatura é reduzida,

os lipídios sofrem uma fase de transição de um estado fluído, na qual a interação entre as cadeias de ácidos graxos são relativamente desorganizadas, para um estado de gel, no qual a cadeia de ácidos graxos torna-se rígida e paralela (Amman & Graham, 1992). Os efeitos causados pela fase de transição dos lipídios provocam respostas cinéticas não-lineares em algumas enzimas, incluindo algumas ATPases de membrana, cuja atividade depende do estágio físico dos lipídios (Holt, 2000).

Outros componentes da membrana podem ser alterados pelo estresse da temperatura. As proteínas da membrana são agrupadas na fase de transição lipídica, e é esperado que isso altere a função, especialmente das proteínas que necessitam modulação estrutural para realizar sua função, como os canais iônicos protéicos (Holt, 2000).

Também a permeabilidade da membrana aumenta no resfriamento (Robertson & Watson, 1986), devido ao incremento nas alterações da membrana ou a efeitos específicos nos canais protéicos. A regulação do cálcio é afetada pela refrigeração, o que provoca sérias conseqüências na função celular (Bailey & Buhr, 1994), sendo as alterações, em alguns casos, incompatíveis com a viabilidade da célula. A 5°C, aumenta a permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} : ele se acumula na célula, contribuindo para alterações semelhantes às ocorridas no processo da capacitação e nos eventos de fusão entre a membrana plasmática e a membrana externa do acrossoma (Watson, 1995).

Alterações significativas na pressão osmótica, meio ao qual o espermatozóide é submetido, ocorrem na criopreservação. O estresse induzido

pela formação dos cristais de gelo é principalmente associado a alterações na pressão osmótica da fração não-congelada (Watson & Ducan, 1988). A água congela e cristaliza como gelo fora da célula; a pressão osmótica do líquido remanescente do soluto aumenta e a membrana espermática é extremamente sensível ao estresse osmótico (Watson, 2000), o que pode também afetar o citoesqueleto celular (Watson, 1995). Efeitos similares acontecem na descongelação (Holt, 2000).

As razões pelas quais os espermatozoides de diversas espécies possuem sensibilidade diferente durante a criopreservação incluem: a complexa estrutura da célula espermática, as diferenças de forma e tamanho, as características distintas de acrossomo e a complexa e heterogênea natureza da membrana plasmática (Snoeck, 2003).

A composição da membrana plasmática é um dos fatores que contribuem para a baixa resistência do espermatozoide equino às baixas temperaturas impostas pela congelação. Os espermatozoides desta espécie são mais sensíveis ao choque térmico durante a redução da temperatura, porque possuem menos colesterol em sua membrana plasmática. Esse lipídio está diretamente relacionado com a fluidez desta organela, que é determinada pela proporção colesterol:fosfolipídios, bem como pela natureza de suas cadeias (maior ou menor grau de insaturação). Quanto maior a proporção colesterol:fosfolipídios, principalmente quando estes fosfolipídios possuem cadeias de ácidos graxos polinsaturados, mais resistente é a membrana plasmática às mudanças de temperatura (Amman & Pickett, 1987). O colesterol atua estabilizando a membrana e diminuindo a temperatura na qual a

membrana sofre a mudança de fase fluída-cristalina para gel (Kirk et al., 2001).

2.3.1 Influência do ganhão e do ejaculado

Os indivíduos podem ser classificados como produtores de sêmen de alta e baixa congelabilidade, dependendo das características estruturais da membrana, o que é geneticamente determinado, predispondo os espermatozóides à sobrevivência aos estresses da criopreservação (Watson, 2000).

Diversos autores concordam com a alta variabilidade da qualidade e congelabilidade seminal entre ganhões e mesmo entre ejaculados do mesmo reprodutor. Estima-se que 25% a 30% dos ganhões produzem sêmen considerado de boa congelabilidade, 25% a 50% produzem sêmen com média congelabilidade e 25% a 40% produzem sêmen com reduzida fertilidade (Pickett & Amann, 1993). Foi observado que ejaculados do mesmo ganhão mostram diferenças na habilidade de sobreviver ao processo da congelação. Também foi verificado que 24 a 67% dos ejaculados possuem apenas 35% de motilidade progressiva imediatamente após a descongelação, sendo alguns destes ejaculados descartados por não atingirem qualidade espermática mínima pós-descongelação (Loomis et al., 1983).

2.4 Radicais livres

As espécies reativas de oxigênio (ROS), também conhecidas como

radicais livres, são radicais de oxigênio diatômicos gerados através de sistemas biológicos aeróbicos ou parcialmente aeróbicos a partir de radicais ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido (H_2O_2) e hidroxil (OH^{\cdot}) (Sharma & Agarwal, 1996). O desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, é o que confere alta reatividade a estas moléculas.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre propriamente dito, porém forma radicais altamente tóxicos (OH^{\cdot}), que induzem dano ao DNA e causam rápida perda do potencial fertilizante dos espermatozoides através da peroxidação lipídica da membrana (Saleh & Agarwal, 2002) e da perda da adenosina trifostato do axonema da cauda (De Lamirande & Gagnon, 1992).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2), através da citocromo oxidase mitocondrial, sofre redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O) (Bergendi et al., 1999). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a reativos intermediários como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}), e também a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 1) (Cohen, 1989).

O papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido enfatizado na fisiologia da reprodução e, embora esteja envolvido no controle fisiológico de algumas funções espermáticas, sua produção excessiva é prejudicial, em virtude de reduzir a motilidade espermática, a capacidade de fusão dos gametas e a fertilidade (Guerra et al., 2004).

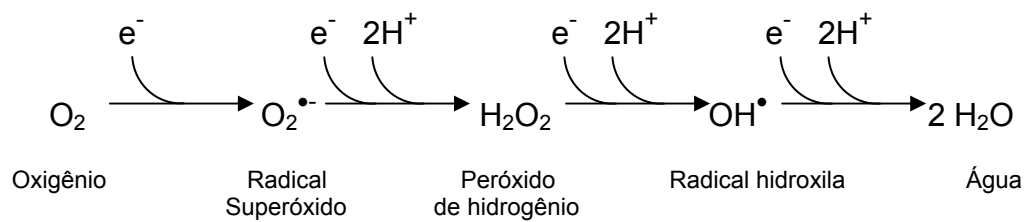


Figura 1 - Redução tetravalente do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água. Adaptado de Boveris, 1998.

O papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido enfatizado na fisiologia da reprodução e, embora esteja envolvido no controle fisiológico de algumas funções espermáticas, sua produção excessiva é prejudicial, em virtude de reduzir a motilidade espermática, a capacidade de fusão dos gametas e a fertilidade (Guerra et al., 2004).

Vários estudos têm demonstrado que os espermatozóides são capazes de produzir quantidades controladas de ROS endógeno, com o objetivo de induzir a capacitação espermática e a reação acrossomal, promovendo sua habilidade fertilizante (De Lamirande & Gagnon, 1995; Rivlin et al., 2004).

Atualmente, existe crescente interesse na produção de ROS gerados pelos componentes celulares do sêmen, pois foi demonstrado que espermatozóides de mamíferos são susceptíveis a danos causados por sua elevada produção, interferindo na integridade das estruturas e na função da célula (De Lamirande & Gagnon, 1995; Rivlin et al., 2004), em virtude de alguns tipos de ROS ($O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 e OH^{\bullet}) atacarem quase todos os componentes celulares, incluindo DNA (Saleh et al., 2002), proteínas e lipídios de membrana (Sharma & Agarwal, 1996).

Nos lipídios de membrana, os radicais livres podem promover

lipoperoxidação, reagindo também com as proteínas de superfície, alterando as características de fluidez e levando, assim, à liberação de subprodutos potencialmente tóxicos.

Existem dois sistemas produtores de ROS espermáticas, um localizado na membrana plasmática (semelhante ao NADPH oxidase), e outro encontrado na peça intermediária, integrado ao sistema respiratório mitocondrial do espermatozóide (oxido-redutase dependente de NADH) (Aitken et al., 1992).

2.4.1 Estresse oxidativo

Em condições normais, observa-se um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e os sistemas de defesa antioxidante do organismo (Sharma & Agarwal, 1996, Ochsendorf, 1999). No entanto, pode ocorrer estresse nas células como consequência do desequilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes encontradas no sêmen (Saleh & Agarwal, 2002). Pode resultar tanto da diminuição das defesas antioxidantes quanto da produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou da combinação de quaisquer desses fatores (Halliwell, 2001).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular. Na adaptação as células podem geralmente tolerar um estresse oxidativo moderado que, na maioria das vezes, resulta em ativação da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Apesar disso, nem sempre o estresse oxidativo precisa

envolver defesas antioxidantes aumentadas (Halliwell, 2001).

Sob condições oxidativas extremas, todos os componentes celulares, incluindo lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares, são alvos potenciais para dano oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1999). A gravidade das lesões depende da natureza e da quantidade de ROS e do momento e duração de exposição, estando ainda associada a fatores extracelulares como temperatura, tensão de oxigênio e ambiente (Agarwal et al., 2003), que pode resultar em morte celular via apoptose ou necrose (Sharma et al., 1999).

As conseqüências diretas dessas lesões serão refletidas na morfologia e funcionalidade do espermatozóide. Alterações como peroxidação da membrana lipídica (Ball & Vo, 2002), inibição do metabolismo (Wang et al., 2003), da motilidade (Jones et al., 1979) e da capacidade fertilizante (Pasqualotto et al., 2000; Agarwal & Said, 2005) já foram relacionadas com a alta concentração de ROS no sêmen.

A possível explicação para a alta susceptibilidade do espermatozóide ao estresse oxidativo, baseia-se no fato de que, em mamíferos, as membranas espermáticas são ricas em ácidos graxos poliinsaturados tornando-as muito fluidas e, ao mesmo tempo, muito vulneráveis a danos peroxidativos (De Laramide & Gagnon, 1995; Sikka, 2004).

Outra explicação para essa fragilidade é que durante os estágios finais da espermatogênese esses gametas descartam grande parte do seu citoplasma, eliminando enzimas citoplasmáticas de defesa que protegem as

células somáticas de danos oxidativos (Griveau & Le Lannou, 1997). Por conseguinte, a capacidade de reparar o DNA também é perdida, tornando-os mais vulneráveis a danos do que qualquer outra célula (Argawal & Said, 2005).

Em condições patológicas, foi constatado um desequilíbrio oxidativo no sêmen humano, que resultou em subfertilidade e infertilidade. No sêmen de pacientes com infertilidade idiopática, infecções genitais, varicocele, teratozoospermia, astenozoospermia e azoospermia foi demonstrado aumento na produção de espécies reativas de oxigênio ou redução das defesas antioxidantes (Agarwal & Said, 2005).

Foi verificado que muitos procedimentos utilizados no processamento do sêmen podem promover aumento na produção de ROS ou diminuição das defesas antioxidantes em amostras de sêmen de animais domésticos submetidos à centrifugação (Twigg et al., 1998; Baumber et al., 2005) e a congelação (Bilodeau et al., 2000; Ball et al., 2001; Chatterjee e Gagnon, 2001).

O processamento do sêmen para resfriamento ou congelação induz a produção de ROS em diversas fases. Aparentemente, a congelação do sêmen produz maior quantidade de ROS e, conseqüentemente, maior dano celular (Bilodeau et al., 2000). Kankofer et al. (2004) investigaram a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, assim como a lipoperoxidação em sêmen equino resfriado. Observaram que a preservação do sêmen por 24h a 5°C não alterou as atividades enzimáticas, bem como não aumentou a lipoperoxidação, sugerindo

que a atividade das enzimas inibe a peroxidação dos lipídios de membrana pelas ROS.

Também no sêmen eqüino, foi verificada maior produção de H_2O_2 em espermatozóides que sofreram injúrias na congelação (Ball et al., 2001).

O processo de descongelação também causa danos oxidativos à célula, decorrente do rápido aumento na utilização de oxigênio pelos espermatozóides, após período de interrupção no metabolismo, determinando maior produção de radicais livres (Ball et al., 2001; Ball & Vo, 2002) e, conseqüentemente, fragmentação de DNA (Baumber et al., 2003).

Em condições normais, a habilidade em contrapor o estresse oxidativo mediado pela elevada produção de ROS depende da quantidade de antioxidantes celulares (Rice-Evans & Burdon, 1993), denominados de capacidade antioxidante total ou mecanismos antioxidativos, presentes em quase todos os tecidos e suas secreções (Jones et al., 1979).

2.4.2 Defesas antioxidantes

Antioxidantes são inibidores de radicais livres, suprimindo a formação ou as ações das ROS.

A proteção contra a elevada produção de ROS e a prevenção de danos celulares, encontrada nos espermatozóides ou no plasma seminal são de grande importância para a fisiologia da reprodução (Lewis et al., 1997; Ochsendorf et al., 1998), uma vez que evidências têm sugerido que a baixa capacidade antioxidante encontrada no sêmen está relacionada à infertilidade

masculina (Sikka, 2004).

Para evitar os efeitos danosos das espécies reativas de oxigênio, existem mecanismos eficientes para a sua eliminação, como a produção de agentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.

Em condições normais, o organismo é protegido contra o dano oxidativo induzido por radicais livres, através de vários antioxidantes com diferentes funções, que constituem um sistema de defesa tanto independente quanto cooperativo, ou mesmo sinérgico.

2.4.2.1 Enzimas antioxidantes

As enzimas de defesa antioxidante operam num sistema coordenado e balanceado, atuando juntamente com outros antioxidantes não-enzimáticos (como o α -tocoferol, ácido ascórbico e glutathione), a fim de proteger o organismo do dano celular causado pelo estresse oxidativo.

2.4.2.1.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A SOD é a principal defesa contra o íon superóxido, um dos principais fatores da toxicidade do O_2 (Halliwell & Gutteridge, 1999). É uma metaloenzima, cuja forma depende tanto da localização quanto do metal presente em sua estrutura. Apesar dessas diferenças, todas as formas catalisam a mesma reação: aceleram grandemente a dismutação do íon superóxido, formando peróxido de hidrogênio e oxigênio (Figura 2) (Halliwell &

Gutteridge, 1999).

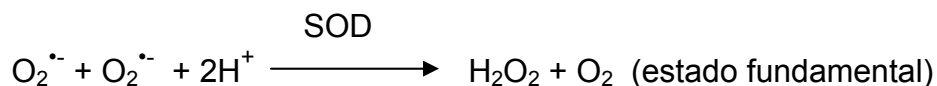


Figura 2 - Reação de dismutação do radical superóxido. Adaptado de Halliwell & Gutteridge, 1999.

Quando ocorrem altas concentrações de peróxido de hidrogênio é favorecida a formação de íons hidroxila, que são os agentes oxidativos mais reativos. Por isso, o controle da concentração do H_2O_2 é de extrema importância para a manutenção da viabilidade celular.

2.4.2.1.2 Catalase (CAT)

A catalase é a enzima que irá catalisar diretamente a decomposição do H_2O_2 ao oxigênio no estado fundamental. O mecanismo de reação da CAT é, assim como o da SOD, essencialmente uma dismutação: uma molécula de H_2O_2 é reduzida a H_2O e a outra é oxidada a O_2 (Figura 3).



Figura 3. Reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao oxigênio no estado fundamental (O_2). Adaptado de Halliwell & Gutteridge (1999).

2.4.2.1.3 Glutationa Peroxidase (GPx)

Essa enzima atua removendo o H_2O_2 e reduzindo-o a H_2O , concomitante com a oxidação da glutatona reduzida (GSH), que age como doador de hidrogênios (Figura 4). Pode também agir em outros peróxidos que não o H_2O_2 (Figura 5), sendo assim considerada um dos principais sistemas de defesa antioxidante (Wendel, 1981).

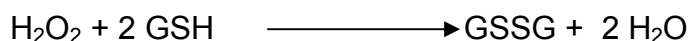


Figura 4. Reação de redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água (H_2O) com concomitante oxidação da glutatona reduzida (GSH). Adaptado de Halliwell & Gutteridge (1999).



Figura 5. Reação de redução de peróxidos a álcoois, catalisada pela GPx. Adaptado de Halliwell & Gutteridge (1999).

2.4.2.2 Antioxidantes não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos são substâncias que, em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retardam ou previnem sua oxidação. Desse modo, os antioxidantes atuam como protetores contra a oxidação de biomoléculas por radicais livres, impedindo a reação em cadeia desencadeada. (Halliwell & Gutteridge, 1999).

2.4.2.2.1 Ácido Ascórbico

Também conhecido como Vitamina C, o ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel essencial (Halliwell & Gutteridge, 1999). Tem como principal função a regeneração do α -tocoferol, a partir de tocoferol e radicais livres de oxigênio (Buettner, 1993). Desta forma, atua sinergisticamente com a vitamina E, protegendo a membrana da peroxidação lipídica, reduzindo a produção de ROS induzida por H_2O_2 e evitando danos ao DNA espermático (Donnelly et al., 1999).

2.4.2.2.2 α -Tocoferol (Vitamina E)

A vitamina E (α -Tocoferol e seus derivados) é um antioxidante lipossolúvel, que atua protegendo as células de radicais de oxigênio *in vivo* e *in vitro*. Parece ser o inibidor primário de radicais livres encontrados em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos e no plasma seminal (Sikka, 2004).

Quando reage com um radical livre, forma-se o radical tocoferoxil, que pode ser regenerado à α -tocoferol pelo ácido ascórbico ou pela GSH (Ward & Peters, 1995; Halliwell & Gutteridge, 1999).

2.4.2.2.3 Glutathiona

A glutathiona, um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, é o principal tiol intracelular de baixo peso molecular presente na maioria das

células. É um antioxidante endógeno que atua sinergisticamente com o α -tocoferol e o com o ácido ascórbico, sendo fundamental para mantê-los na forma reduzida. Atua também como um cofator enzimático, sendo particularmente importante na reação catalisada pela glutathione peroxidase, enzima que decompõe peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

Os reagentes utilizados para os ensaios bioquímicos foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA) e o ácido tiobarbitúrico fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os diluentes utilizados na criopreservação do sêmen (FR-1 e FR-5) foram fornecidos pela Nutricell Nutrientes Celulares (Campinas, SP, Brasil).

3.2 Local de execução

O presente experimento foi conduzido junto ao Laboratório de Inseminação Artificial da Faculdade de Veterinária da UFRGS e ao Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

3.3 Animais

Foram utilizados seis garanhões da raça Crioula comprovadamente

férteis e em atividade sexual, com idades variando entre 6 e 9 anos, provenientes de dois criatórios localizados nos municípios de Cruzeiro do Sul e Taquara, no Rio Grande do Sul. Todos os animais apresentavam-se saudáveis e boas condições corporais. Os animais foram mantidos sob o mesmo regime de manejo e alimentação, sendo soltos em piquetes durante o dia e estabulados à noite. A alimentação foi à base de aveia, ração comercial e feno de alfafa.

3.4 Coleta do sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas utilizando-se vagina artificial modelo Hannover (Götze, 1949). Além do tubo interno de borracha, foi utilizado um segundo tubo interno de plástico descartável, lubrificado com vaselina estéril e copo coletor plástico esterilizado (Mattos, 1995). A temperatura interna da vagina artificial ficava entre 42°C e 45°C. Para a realização das coletas, utilizou-se uma égua em cio e devidamente contida com peias e com a cauda protegida. No momento da monta, o pênis ereto foi desviado em direção da vagina artificial. A ejaculação foi detectada pelos jatos ejaculatórios, verificados com a palma da mão colocada na porção ventral do pênis. Estes procedimentos foram descritos por Klug (1982).

3.5 Exame do sêmen

3.5.1 Exame macroscópico do sêmen

Inicialmente, procedeu-se à avaliação do volume, aferido em proveta graduada em mL; do aspecto, avaliado de acordo com sua consistência (aquoso, soroso, leitoso e cremoso) e da coloração do ejaculado (branco-acinzentado e branco-citrino).

A seguir, foi feita a separação da fração gel, quando existente, com uma pipeta Pasteur, e a filtração da porção rica do sêmen através de uma gaze estéril.

3.5.2 Motilidade espermática

A motilidade progressiva e a motilidade total dos espermatozóides foi aferida logo após a filtração do sêmen. Uma gota de sêmen de aproximadamente 20 μ L foi colocada entre lâmina e lamínula, ambas pré-aquecidas a 37°C sobre mesa térmica. A amostra foi observada em microscópio de contraste de fase, utilizando-se aumento de 250x. A avaliação de cada característica foi realizada de forma subjetiva, pelo mesmo observador, conforme definição de Kenney *et al.* (1983).

A motilidade progressiva foi avaliada pela porcentagem de espermatozóides que se movimentavam ativamente de forma retilínea e em círculos amplos. Considerou-se como motilidade total a porcentagem de espermatozóides que apresentavam movimento.

3.5.3 Determinação da concentração espermática

Uma alíquota de 0,05 mL de sêmen foi diluída em 9,95 mL de solução formol-salina (4 mL de formol em 96 mL de citrato de sódio 2,94%) para determinação da concentração espermática através de contagem em câmara hematimétrica (Neubauer). As duas áreas da câmara (superior e inferior) foram preenchidas com sêmen diluído. Cinco quadrados de cada uma das duas áreas foram avaliados. A soma dos espermatozóides contados nos 10 quadrados foi multiplicada por 5×10^6 para se obter a concentração espermática por mL. O número total de espermatozóides do ejaculado foi obtido através da multiplicação da concentração espermática encontrada pelo volume da amostra.

3.5.4 Integridade física da membrana

Foi determinada pelo método descrito por Kneissl (1993). Foi adicionado 960 μ L de sêmen, 10 μ L de iodeto de propídio (PI) e 20 μ L de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) dentro de um pequeno frasco previamente envolto em papel alumínio, para evitar o contato com a luz. As amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C por 8 minutos. Após este período, foi adicionado 20 μ L de formol-citrato para que ocorresse a imobilização dos espermatozóides, e colocada uma gota entre lâmina e lamínula para análise em microscópio de epifluorescência, em aumento de 1000x, sob imersão. Um total de 100 espermatozóides por amostra de sêmen congelado foi avaliado, sendo considerados com a membrana íntegra aqueles

corados em verde. As células totalmente coradas de vermelho foram consideradas com a membrana danificada. Espermatozóides visualizados corados tanto com diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo foram considerados com membrana danificada.

3.5.5 Integridade funcional da membrana

Para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática foi utilizado o teste hiposmótico (HOS), de acordo com a técnica de Lomeo & Giambersio (1991) modificada por Lagares *et al.* (1998). Duzentos microlitros de água destilada foram adicionados a 100 μ L de sêmen, perfazendo uma osmolaridade de 100 mOsmol/kg. Posteriormente, as amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C por 8 minutos e uma gota de cada amostra foi colocada entre lâmina e lamínula para análise em microscópio de contraste de fase em aumento de 400x, sendo observados 100 espermatozóides das amostras de sêmen congelado. Foram considerados espermatozóides com a membrana funcional aqueles que aumentaram de volume, apresentando enrolamento de cauda.

3.6 Criopreservação de sêmen

Após a coleta e o exame, o ejaculado foi diluído na proporção de 1:1 em FR-1 e centrifugado a 400g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, mantendo-se 2,5 a 5% de plasma seminal. Foi acrescentado o diluente de congelação FR-5. A composição dos diluentes para centrifugação

(FR-1) e congelação (FR-5) está descrita na Tabela 1. A concentração final foi ajustada para 200×10^6 spz/mL. Foram utilizadas palhetas de 0,5 mL (IMV, Minneapolis, MN, EUA), que após preenchidas foram lacradas com álcool polivinílico.

TABELA 1 - Composição dos diluentes utilizados na criopreservação do sêmen eqüino.

Diluentes	
FR-1	FR-5
Glicose	Glicose
Lactose	Lactose
Rafinose	Rafinose
Citrato de sódio	Citrato de sódio
Citrato de potássio	Citrato de potássio
Hepes	Hepes
	Leite desnatado
	Gema de ovo
	Gentamicina
	Glicerol

A criopreservação foi realizada conforme descrito por Martin *et al.* (1979), colocando-se as palhetas horizontalmente em vapor de nitrogênio, a quatro cm da fase líquida por 20 minutos, mergulhando-as, em seguida, no nitrogênio líquido e estocadas em botijão criogênico a -196°C .

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, após um período mínimo de sete dias de armazenamento, sendo então o sêmen avaliado quanto a motilidade total e progressiva e integridade física e funcional da membrana plasmática dos espermatozóides. A seqüência das avaliações e procedimentos realizados com o sêmen dos garanhões está descrita na Figura 6.

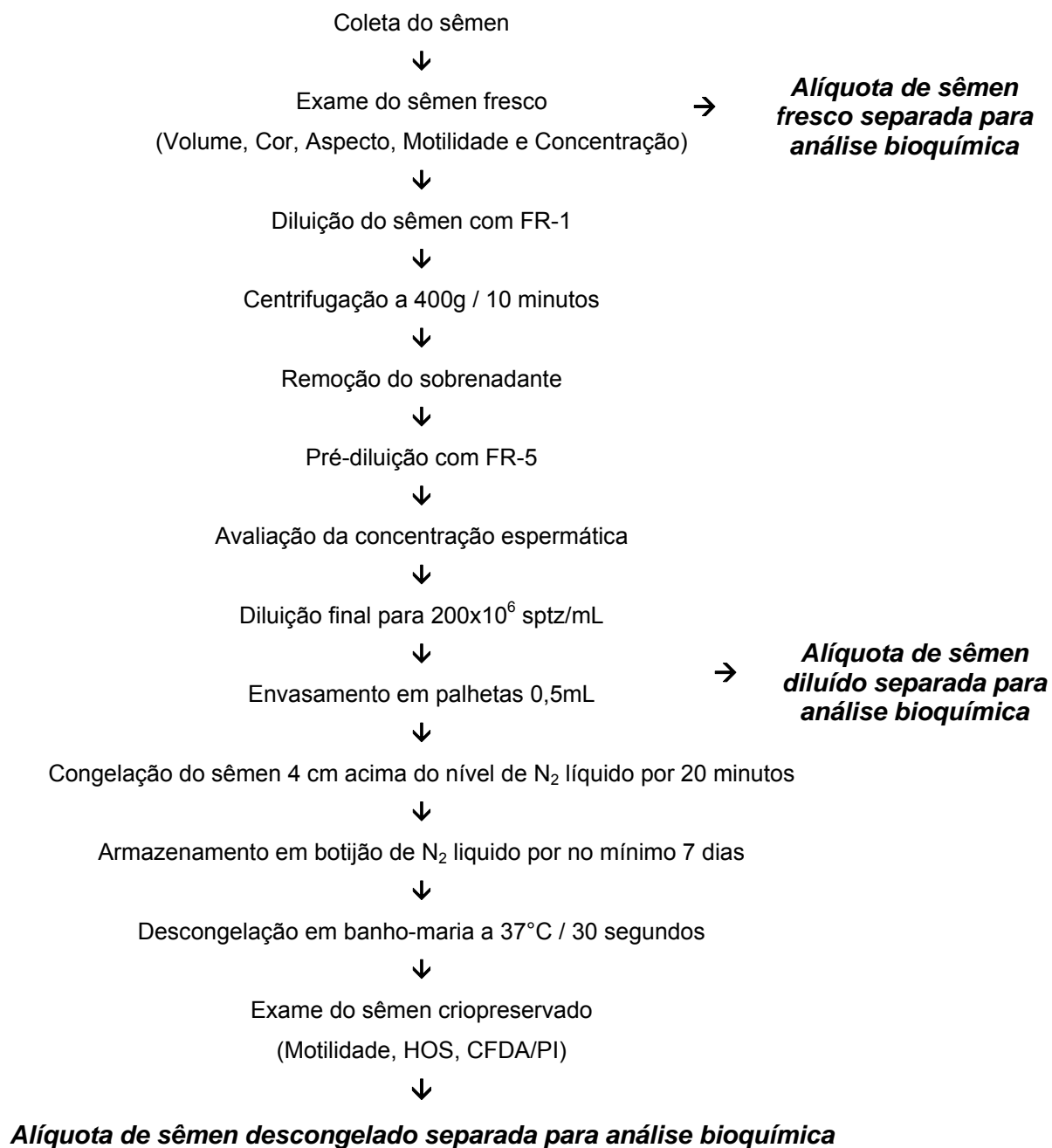


FIGURA 6 - Fluxograma do protocolo de criopreservação do sêmen equino e avaliação espermática.

3.7 Ensaios bioquímicos

3.7.1 Preparo das amostras

Com o objetivo de estudar a atividade das enzimas antioxidantes, dos antioxidantes não enzimáticos e da peroxidação lipídica durante o processo de criopreservação do sêmen eqüino, foram escolhidos três fases: sêmen fresco, sêmen diluído em FR-5 pré-congelação e sêmen descongelado.

As amostras foram preparadas em tubo plástico tipo Eppendorf® adicionando-se 100 μ L de sêmen em 600 μ L de tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,4 com cloreto de potássio 100mM. Após homogeneização, as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -20°C até o dia do ensaio.

3.7.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi aferida segundo Marklund (1985). Este método é baseado na capacidade de autooxidação do pirogalol, um processo altamente dependente de $O_2^{\bullet-}$. A inibição da autooxidação deste composto ocorre na presença de SOD, cuja atividade na amostra (15 μ L) foi medida indiretamente em 420nm, utilizando um espectrofotômetro de feixe duplo com controle de temperatura (Hitachi U-2001). Foi realizada uma curva de calibração com SOD purificada como padrão, a fim de se estimar a atividade de SOD nas amostras testadas. Os resultados são expressos em unidades de SOD/mg de proteína.

3.7.3 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase foi avaliada segundo o método descrito por Aebi (1984), utilizando-se um espectrofotômetro de feixe duplo com controle de temperatura (Hitachi U-2001). A metodologia é fundamentada na degradação de H_2O_2 em 240nm pela amostra (30 μL), em um meio de reação contendo 20nM H_2O_2 , 0,1% de Triton X-100, tampão fosfato de potássio 10mM pH 7,0. Uma unidade é definida como um μmol de H_2O_2 consumido por minuto, e a atividade específica é expressa como unidades por mg de proteína.

3.7.4 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi medida de acordo com o método descrito por Wendel (1981) utilizando *tert*-butil-hidroperóxido com substrato. A degradação do NADPH da amostra (90 μL) foi monitorada em 340nm utilizando um espectrofotômetro de feixe duplo com controle de temperatura (Hitachi U-2001). O meio era constituído de glutathiona 2mM, 0,15 U/mL de glutathiona redutase, 0,4 mM de azida, 0,5 mM de *tert*-butil-hidroperóxido e 0,1 mM de NADPH. Uma unidade de GPx é definida como um μmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica é representada como unidades por mg de proteína.

3.7.5 Potencial antioxidante total (Total radical-trapping antioxidant potential - TRAP)

Avalia a capacidade antioxidante não enzimática, sendo determinada pela intensidade da quimiluminescência do luminol induzida pela termólise do 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP). A reação ocorre em um tubo de cintilação, sendo medida em um contador de cintilação Wallac 1409 (Lissi et al., 1992; Evelson et al., 2001). O valor inicial da quimiluminescência foi obtido na associação de ABAP 10mM (diluído em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4) com luminol (5,6mM). Em seguida, foi adicionado ao tubo 10 μ L de Trolox (análogo hidrossolúvel do α -tocoferol) e a quimiluminescência foi medida até alcançar os níveis iniciais. Para análise das amostras foi efetuado o mesmo procedimento substituindo-se o Trolox (padrão) pelas amostras (10 μ L). O tempo necessário para que a intensidade da quimiluminescência volte ao valor inicial é chamado de tempo de indução, sendo diretamente proporcional a capacidade antioxidante da amostra. O tempo de indução da amostra foi comparado com o apresentado pelo Trolox. Os resultados foram expressos em nmol Trolox/mg de proteína.

3.7.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico é uma metodologia utilizada para estimar a lipoperoxidação em amostras biológicas. As TBA-RS foram medidas conforme descrito por Esterbauer & Cheeseman (1990), utilizando um espectrofotômetro Beckman DU[®]640. Em

tubos de ensaio, foram adicionados 300 μ L de ácido tricloroacético 10% resfriado e 150 μ L de amostra, sendo centrifugado a 300g por 10 minutos. Em seguida, 300 μ L do sobrenadante foram transferidos para um tubo Pyrex, sendo incubado com 0,67% de ácido tiobarbitúrico em sulfato de sódio 7,1% em banho-maria fervente por 25 minutos. Após, os tubos foram resfriados em água por 5 minutos, procedendo-se à leitura em espectrofotômetro ($\lambda = 535\text{nm}$). O ácido orgânico não produz cor quando testado sem a amostra, demonstrando a ausência de reação direta do ácido tiobarbitúrico. A curva de calibração foi feita usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão, da mesma forma que as amostras. As TBA-RS foram calculadas como nmol TBA-RS/mg de proteína.

3.7.7 Dosagem de proteína na amostra

Todos os ensaios bioquímicos têm seus resultados expressos em relação à quantidade de proteína nas amostras. A concentração protéica foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

3.8 Delineamento experimental e análise estatística

Foi realizada análise de variância, em um delineamento em blocos casualizados, sendo considerados como blocos os garanhões e como tratamentos o sêmen fresco, diluído e congelado. Para a comparação entre médias foi utilizado o teste de Tukey, tendo sido adotado o nível de significância de 5%. As seguintes variáveis sofreram transformação: Catalase:

logaritmo natural, TBA-RS: logaritmo natural, SOD: $\log(x + 1)$; onde x da variável.

4. RESULTADOS

4.1 Exame de sêmen

Na Figura 7 estão expressos os valores da média e do desvio padrão da motilidade total e progressiva do sêmen eqüino fresco e congelado.

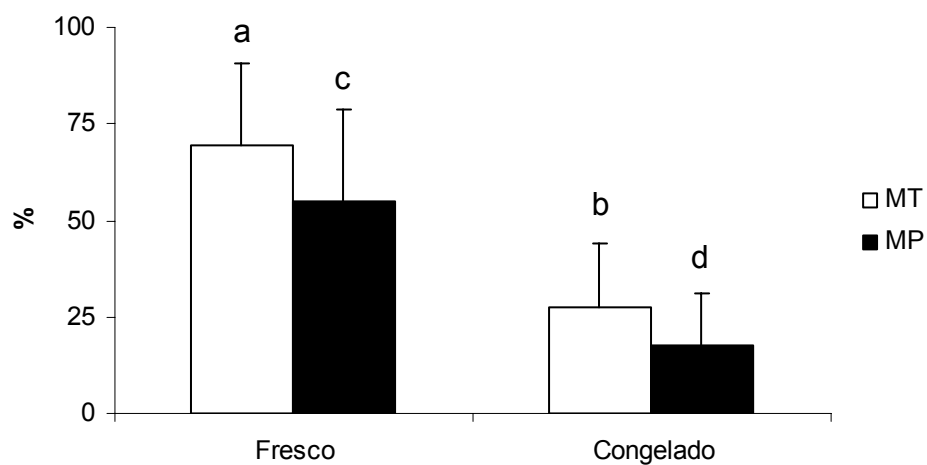


FIGURA 7 – Valores da média e o desvio padrão da motilidade total (MT) e progressiva (MP) do sêmen eqüino fresco e congelado. Letras diferentes nas colunas de mesma cor representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Ao analisar a Figura 7 verifica-se uma queda significativa ($p < 0,05$) tanto na motilidade total como na motilidade progressiva do sêmen fresco para o congelado. A motilidade total apresentou uma queda de 39,8% e a motilidade

progressiva de 31,9% do sêmen fresco para o congelado.

Na Figura 8 são apresentados os valores da média e do desvio padrão de espermatozoides com integridade física e funcional de membrana, do sêmen eqüino congelado.

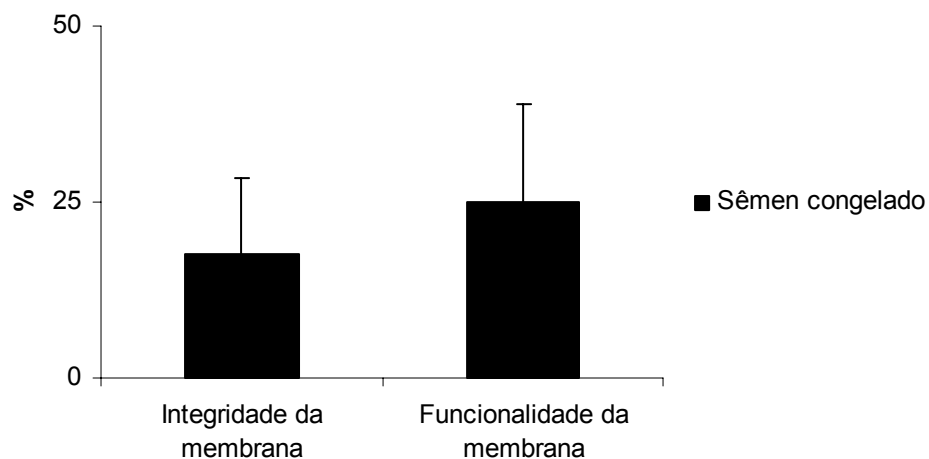


FIGURA 8. Valores de média e do desvio padrão de espermatozoides com integridade física e funcional de membrana, do sêmen eqüino congelado.

Na Tabela 2 estão expressos os valores da média e do desvio padrão das características macro e microscópicas dos ejaculados dos seis garanhões.

TABELA 2 - Valores da média e do desvio padrão das características macro e microscópicas dos ejaculados dos seis garanhões.

Garanhão	A	B	C	D	E	F
Número de coletas	3	3	3	2	2	2
Volume sem gel (mL)	37,2 ± 6,2	34 ± 5,5	41,1 ± 4,7	32,3 ± 6,3	30,7 ± 7,6	29,8 ± 7,7
Concentração (x 10 ⁶ spz/ml)	190,5 ± 32,1	201,4 ± 27,4	205,5 ± 40	211,1 ± 22,3	198,4 ± 11,6	170,5 ± 23,4
MT fresco (%)	83,3 ± 5,8	85,0 ± 7,1	65,0 ± 8,7	32,5 ± 3,5	90,0 ± 0	60,0 ± 7,1
MP fresco (%)	68,3 ± 2,9	75,0 ± 14,1	50,0 ± 8,7	17,5 ± 3,5	78,3 ± 2,9	40,0 ± 7,1
MT congelado (%)	26,7 ± 5,8	35,0 ± 7,1	15,0 ± 8,7	17,5 ± 10,6	56,7 ± 10,4	15,0 ± 7,1
MP congelado (%)	16,7 ± 5,8	25,0 ± 7,1	6,7 ± 2,9	7,5 ± 3,5	41,7 ± 10,4	7,5 ± 3,5
Integridade de membrana (%)	31,3 ± 17,1	6,0 ± 4,2	18,0 ± 3,6	7,5 ± 10,6	29,0 ± 5,2	14,5 ± 0,7
Funcionalidade de membrana (%)	7,7 ± 3,5	20,0 ± 0,0	13,0 ± 8,7	40,5 ± 0,7	40,7 ± 17,9	29,0 ± 9,9

MT: Motilidade total; MP: motilidade progressiva

4.2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

Os valores da média e do desvio padrão do logaritmo da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no sêmen fresco, diluído e congelado estão expressos na Figura 9.

Pela análise da Figura 9, observa-se que a atividade antioxidante da enzima superóxido dismutase demonstrou queda significativa ($p < 0,0001$) do sêmen fresco para o sêmen diluído e congelado, não havendo diferença significativa ($p = 0,3$) na atividade da enzima superóxido dismutase entre o sêmen eqüino diluído e congelado.

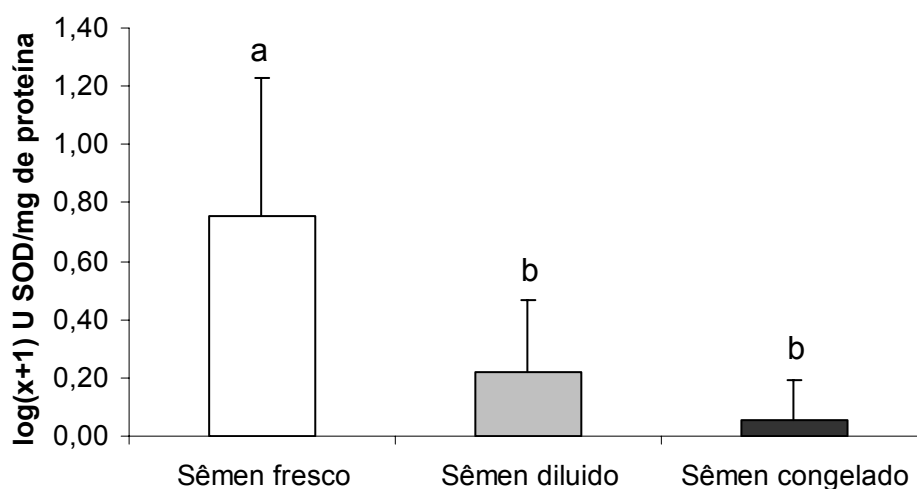


FIGURA 9 - Valores da média e do desvio padrão do logaritmo da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no sêmen eqüino, fresco, diluído e congelado. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,0001$).

Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na atividade da enzima SOD entre os garanhões no sêmen fresco, diluído e congelado.

Não foi detectada nenhuma atividade da enzima superóxido

dismutase no diluente para congelação do sêmen.

4.3 Atividade da enzima catalase

Os valores da média e do desvio padrão do logaritmo natural da atividade da enzima catalase, no sêmen fresco, diluído e congelado, estão expressos na Figura 10.

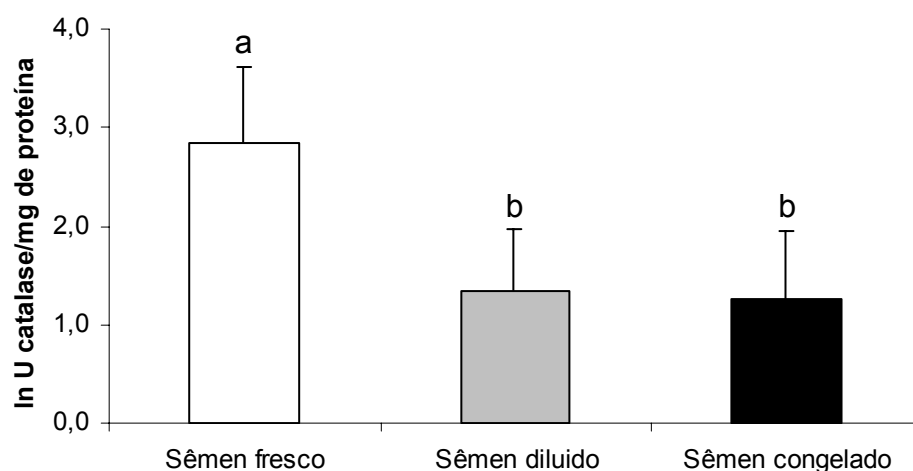


FIGURA 10 - Valores da média e do desvio padrão do logaritmo da atividade da catalase no sêmen eqüino, fresco, diluído e congelado. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,0001$).

Pela análise da Figura 10, observa-se que a atividade antioxidante da enzima catalase demonstrou queda significativa ($p < 0,0001$) do sêmen fresco para o sêmen diluído e congelado. Não houve diferença significativa ($p = 0,946$) na atividade da enzima catalase entre o sêmen eqüino diluído e congelado.

Não foi detectada nenhuma atividade da catalase no diluente para congelação do sêmen.

Os valores da média e do desvio padrão do logaritmo da atividade da enzima catalase, no sêmen fresco, diluído e congelado, dos seis garanhões, estão expressos na Figura 11. Foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) na atividade da enzima catalase, entre garanhões.

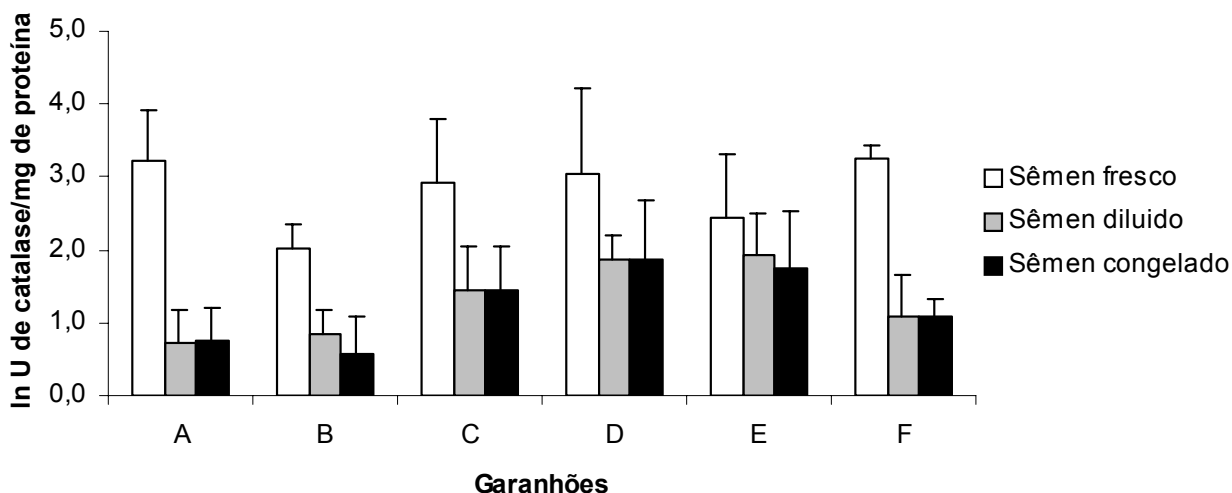


FIGURA 11 - Valores da média e do desvio padrão do logaritmo da atividade da enzima catalase no sêmen fresco, diluído e congelado dos seis garanhões.

4.3 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

Os valores da média e do desvio padrão da atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) no sêmen eqüino fresco, diluído e congelado estão expressos na Figura 12.

Na análise da Figura 12, observa-se que a atividade antioxidante da enzima glutathiona peroxidase demonstrou queda significativa ($p<0,0001$) do sêmen fresco para o sêmen diluído e congelado, não havendo diferença significativa ($p=0,8785$) na atividade da enzima glutathiona peroxidase entre o sêmen eqüino diluído e congelado. Não foram observadas diferenças

significativas ($p < 0,05$) na atividade da enzima GPx entre os garanhões.

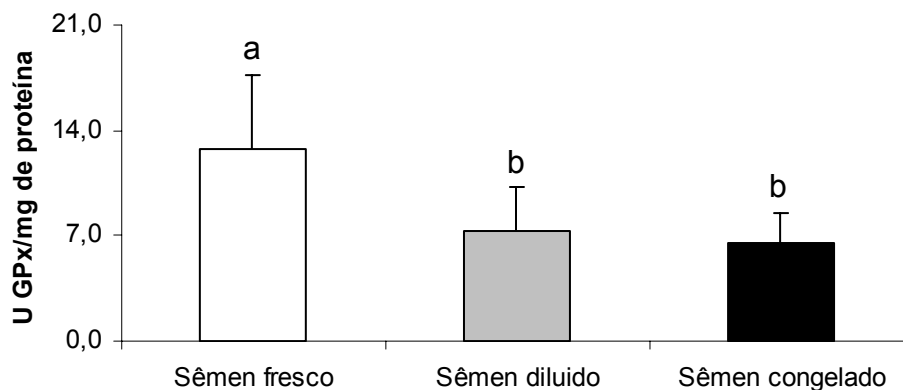


FIGURA 12 - Valores da média e do desvio padrão da atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) no sêmen equino, fresco, diluído e congelado. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,0001$).

Foi detectada atividade da enzima glutatona peroxidase no valor de 4,23 U/mg de proteína no diluente utilizado para congelação do sêmen.

4.5 Potencial antioxidante total (Total radical-trapping antioxidant potential - TRAP)

Neste experimento foi avaliada a capacidade das defesas antioxidantes não enzimáticas no sêmen fresco, diluído e congelado. Os valores da média e do desvio padrão do potencial antioxidante total (TRAP) no sêmen fresco, diluído e congelado, estão expressos na Figura 13.

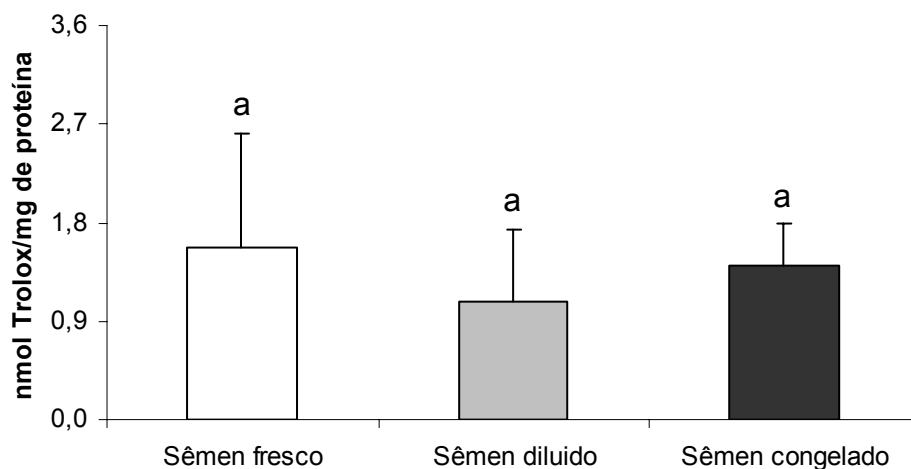


FIGURA 13 - Valores da média e do desvio padrão do potencial antioxidante total (TRAP) no sêmen eqüino, fresco, diluído e congelado. Letras iguais não representam diferença significativa ($p > 0,05$)

Pela análise da Figura 13, observa-se que a capacidade antioxidante total (TRAP) não demonstrou diferença significativa entre o sêmen fresco, diluído e congelado ($p=0,076$).

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) no potencial antioxidante total entre garanhões (Figura 14).

Foi detectada atividade potencial antioxidante total (TRAP) no valor de $0,22 \pm 0,08$ nmol de trolox/mg de proteína no diluente utilizado para congelação do sêmen.

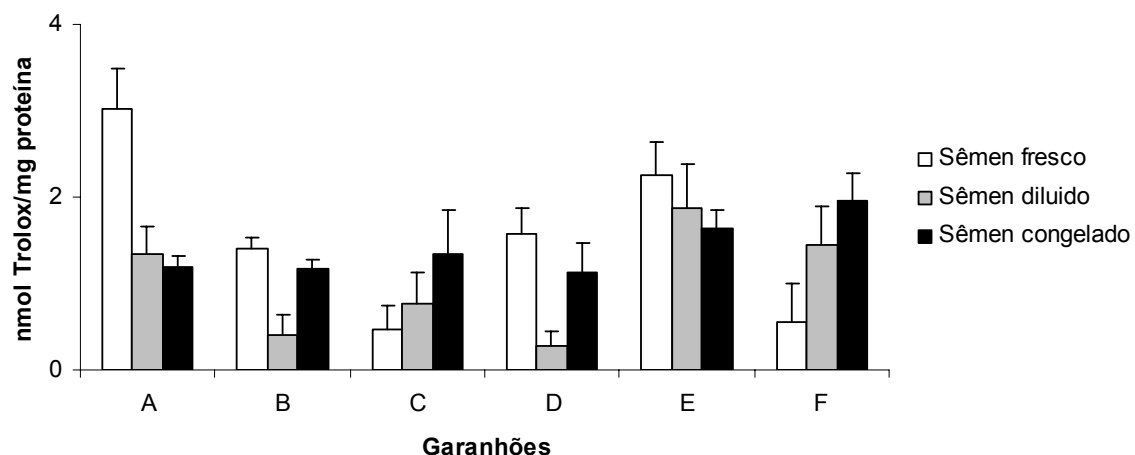


FIGURA 14 - Valores da média e do desvio padrão do potencial antioxidante total (TRAP) no sêmen fresco, diluído e congelado dos seis guaranhões.

4.6 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A peroxidação de lipídios foi avaliada através da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) presentes nas amostras de sêmen fresco, diluído e congelado. Os valores da média e do desvio padrão do logaritmo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no sêmen fresco, diluído e congelado estão expressos na Figura 15.

Ao analisar a Figura 15, observa-se que a presença das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi significativamente superior ($p < 0,001$) no sêmen diluído e congelado, em relação ao sêmen fresco. Não houve diferença significativa entre os valores do sêmen diluído e congelado ($p = 0,8412$).

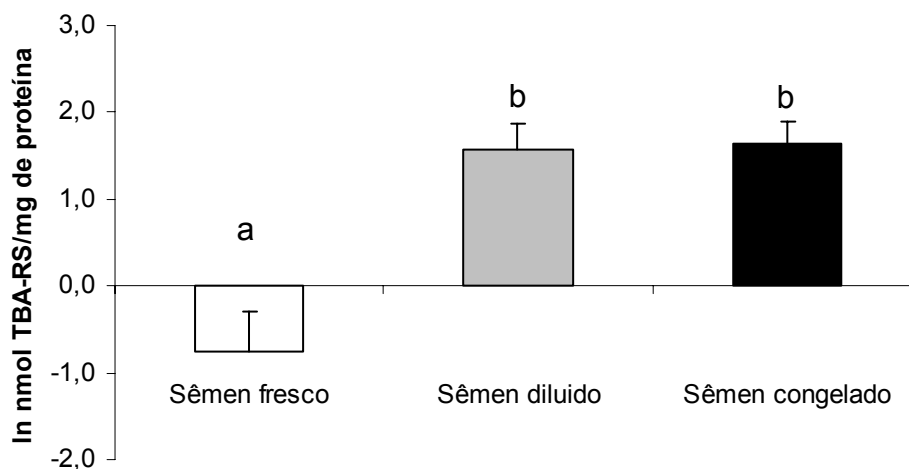


FIGURA 15 - Valores da média e do desvio padrão do logaritmo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), no sêmen equino fresco, diluído e congelado. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,001$).

Na Figura 16 são expressos os valores da média e do desvio padrão do logaritmo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), no sêmen fresco, diluído e congelado dos seis garanhões. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na concentração de TBA-RS entre os garanhões.

O valor das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico detectado no diluente utilizado para congelação do sêmen foi de $3,51 \pm 0,04$ ln nmol TBA-RS/mg de proteína.

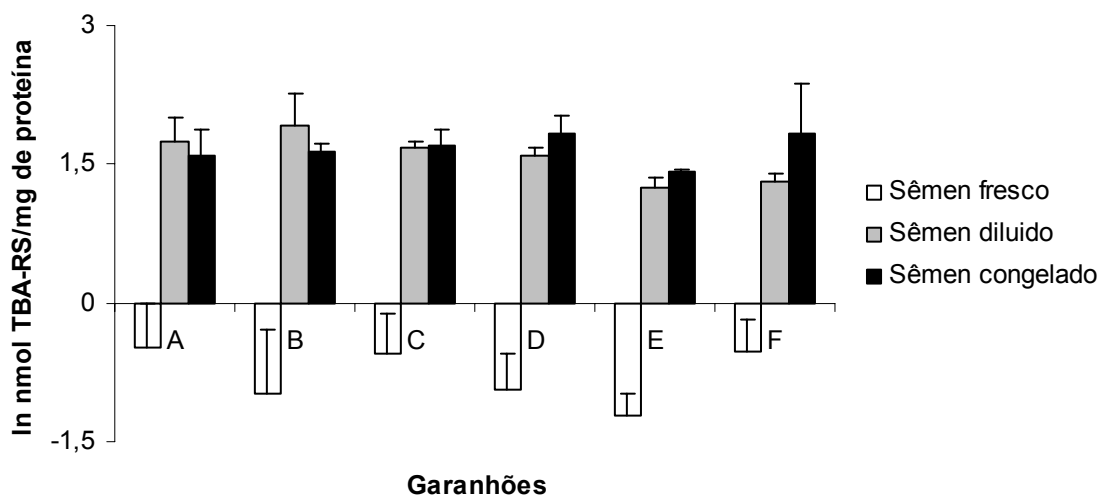


FIGURA 16 - Valores da média e do desvio padrão do logaritmo das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), no sêmen eqüino fresco, diluído e congelado.

4.7 Correlações

Foram observadas correlações significativas entre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e a motilidade total ($r = -0,621$; $p = 0,014$) (figura 17) bem como a motilidade progressiva ($r = -0,605$; $p = 0,017$) (figura 18), no sêmen eqüino congelado.

Não foram encontradas associações entre as demais variáveis estudadas (Apêndices 8 e 9).

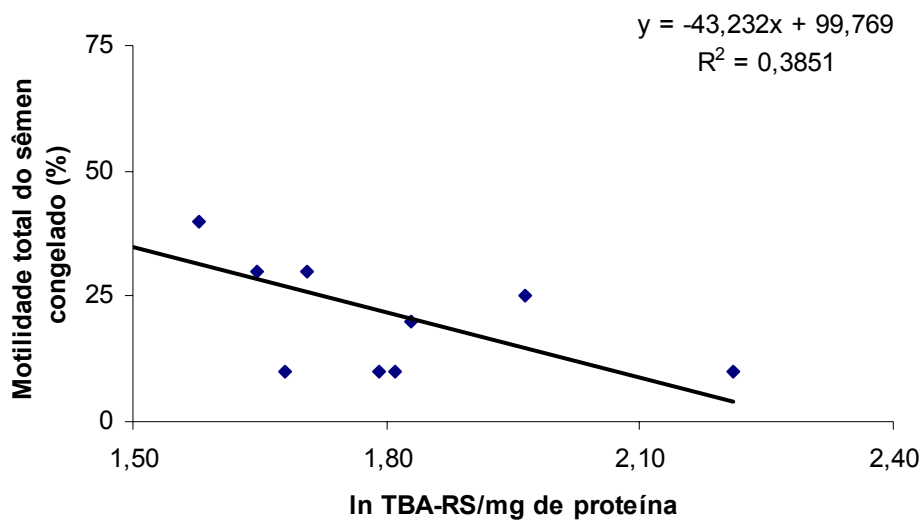


FIGURA 17 – Efeito das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na motilidade total do sêmen congelado.

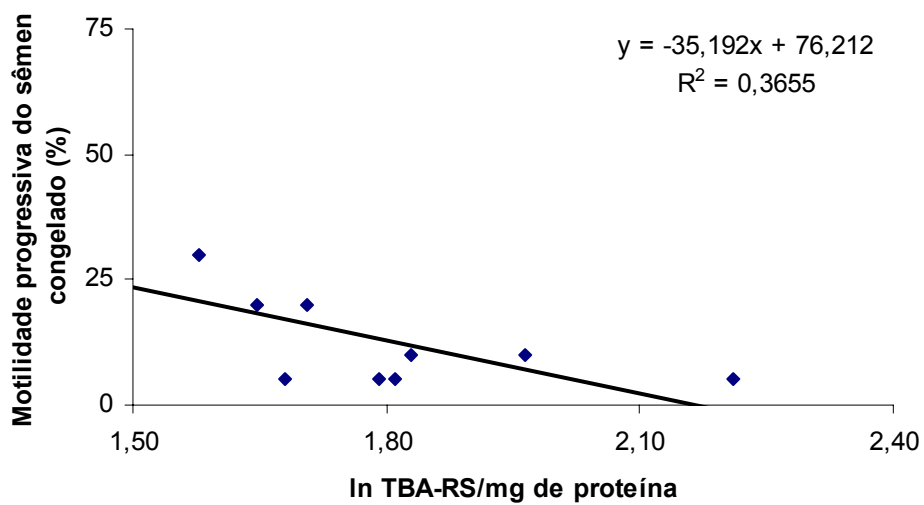


FIGURA 18 - Efeito das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na motilidade progressiva do sêmen congelado.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram avaliadas as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, bem como a peroxidação lipídica no sêmen eqüino fresco, diluído e congelado.

5.1 Características do sêmen

A qualidade do sêmen eqüino é afetada pela criopreservação (Jasko, 1994; Yoshida, 2000; Samper, 2000).

Os valores médios encontrados na avaliação do sêmen eqüino fresco e congelado encontram-se na Tabela 2, situando-se os verificados no sêmen fresco dentro dos referidos pela literatura (McKinnon & Voss, 1993; Hafez, 1995; Magistrini, 2000). Porém, os valores médios observados no sêmen congelado foram inferiores aos referidos por Snoeck (2003) e Baumber et al. (2005).

No presente estudo, um dos parâmetros de avaliação da qualidade do sêmen, a motilidade, tanto a total quanto a progressiva, diminuíram significativamente ($p < 0,001$) depois dos procedimentos de congelação/descongelação. Foi observada uma redução de 39,8% e de 31,9%,

respectivamente, para a motilidade total e progressiva do sêmen fresco para o congelado.

Foi observada variação significativa ($p < 0,05$) entre os ganhões tanto na motilidade total e progressiva do sêmen fresco, como na do sêmen congelado. Os ganhões que apresentaram a maior percentagem de células móveis, pós congelação/descongelação nem sempre foram aqueles que obtiveram as melhores taxas de motilidade no sêmen fresco, corroborando com os descritos por Samper (2000) e Cottorello (2002). Essa diferença na resposta da motilidade pós-descongelação pode ser atribuída às diferenças de resistência a congelação entre ganhões (Combes et al. 2000; Snoeck, 2003).

A integridade da membrana plasmática é um requisito essencial para as células desempenharem sua função (Harrison & Vickers, 1990). Foi observado o valor médio de 17,72% de membranas íntegras pós-descongelação neste estudo, sendo 9,93 pontos percentuais menor que a percentagem média de motilidade total pós-descongelação (27,65%). Esses resultados confirmam a tendência encontrada por Snoeck (2003) para o sêmen congelado eqüino, que observou motilidade de 56,1% com a percentagem de células íntegras de 34,6% e também com os estudos de Valcárcel et al. (1994), onde a avaliação da motilidade foi de 47,35% e a da integridade de membrana 13,4% no sêmen ovino pós-descongelação. Para os autores, normalmente após a descongelação, a integridade das membranas do espermatozóide é reduzida drasticamente, embora essa resposta não seja acompanhada na mesma proporção pela motilidade.

Entretanto, não foi observada diferença entre a percentagem de

espermatozóides com motilidade progressiva (17,51%) e a percentagem de espermatozóides com membrana íntegra pós-descongelção (17,71%), o que está de acordo com o descrito por Harkema & Boyle (1992), que referem valores semelhantes para espermatozóides móveis (41%) e com membrana íntegra (49%) no pós-descongelção de sêmen eqüino.

O teste hiposmótico (HOS) foi empregado para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides. O resultado do teste HOS é expresso de acordo com a percentagem de células que sofrem influxo de líquido e respondem com alguma alteração morfológica de cauda. Os espermatozóides que sofrem alterações de cauda como enrolamento e/ou dobramento são considerados competentes e funcionais.

A percentagem de espermatozóides reativos ao teste de funcionalidade de membrana (HOS) pós-descongelção foi similar aos valores da motilidade total do sêmen descongelado, 25,15% e 27,65% respectivamente. Foi observado o valor médio de 25,15% de membranas funcionais íntegras pós-descongelção, sendo 7,64 pontos percentuais maior que a percentagem média de motilidade progressiva pós-descongelção (17,51%). Esses resultados concordam com os descritos por Neild et al. (1999) e por Lagares et al. (2001), que observaram maior percentagem de células reativas ao teste hiposmótico em comparação com a motilidade progressiva. Entretanto, Papa et al. (2001), Dell'Aqua Júnior et al. (2002) e Snoeck (2003), relataram que os valores para a integridade funcional da membrana foram inferiores aos encontrados para motilidade total e progressiva.

Apesar da relativa simplicidade do teste hiposmótico, os

pesquisadores têm relatado diferentes protocolos, bem como diversas formas de interpretação dos dados. Este fato dificulta a comparação dos testes entre os autores, tornando as conclusões extremamente questionáveis. Isso pode explicar a grande variação nas respostas de motilidade *versus* a percentagem de espermatozóides com membrana funcional pós-descongelamento entre pesquisadores (Snoeck, 2003).

Também foi verificada uma variação significativa ($p < 0,05$) entre os reprodutores, tanto na integridade quanto na funcionalidade da membrana espermática do sêmen congelado, indicando, com isso, uma diversidade de comportamento entre os parâmetros espermáticos dos animais.

Os reprodutores manifestaram um comportamento mais uniforme no que se refere ao volume do sêmen e à concentração espermática, o que está de acordo com o referido por Pickett (1993) e Magestrini, (2000).

5.2 Atividade dos antioxidantes enzimáticos

Para o estudo das defesas antioxidantes enzimáticas foram realizadas mensurações das atividades das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase.

A atividade média da catalase, observada no sêmen fresco, foi de $21,95 \pm 14,25$ U/mg de proteína, inferior aos $98,7 \pm 29,2$ U/mg de proteína encontrados por Ball et al. (2000), que verificaram alta atividade dessa enzima antioxidante no plasma seminal eqüino, porém observaram que a atividade específica desta enzima é maior nos espermatozóides do que no plasma

seminal, e sua concentração variou entre reprodutores, como no presente estudo. Cabe ressaltar que os autores quantificaram a atividade da catalase no sêmen fresco (plasma seminal e espermatozóide, separadamente) e a avaliação da atividade da enzima no nosso estudo foi realizada no sêmen total, isto é, espermatozóides juntamente com o plasma seminal.

Diversos pesquisadores referem diferentes métodos para a avaliação da atividade das enzimas glutationala peroxidase e superóxido dismutase (Sanocka et al., 1997; Zini et al., 2000; Kankofer et al., 2004), utilizando distintas unidades (pkat/mg de proteína, U/10⁶ spz) no sêmen dos animais. Isto torna a comparação dos valores médios da atividade dessas enzimas entre autores extremamente difícil e de arriscada interpretação.

As três enzimas tiveram comportamentos similares, apresentando atividade significativamente superior ($p < 0,001$) no sêmen fresco, em relação ao sêmen diluído e ao sêmen congelado, não havendo diferença entre os dois últimos. A redução média da atividade das enzimas do sêmen fresco para o diluído foi da ordem de 64% para a catalase; 43,1% para a glutationala peroxidase e 78% para a superóxido dismutase. Não houve redução significativa ($p > 0,05$) na atividade dessas três enzimas no sêmen diluído para o congelado. Esses resultados estão de acordo com o descrito por Bilodeau et al., (2000) que referem maior atividade de superóxido dismutase e de glutationala peroxidase antes da criopreservação do sêmen na espécie bovina. Esses achados podem corroborar com outros eventos que ocorrem durante a criopreservação do sêmen, resultando na redução irreversível na motilidade e na capacidade fertilizante dos espermatozóides.

A queda nas defesas antioxidantes enzimáticas do sêmen fresco para o sêmen diluído e congelado pode ser atribuída à retirada de 90 a 95% de plasma seminal após a centrifugação do sêmen. Este procedimento é preconizado por diversos autores que mostraram o efeito prejudicial do plasma seminal junto à fração celular do ejaculado submetido a criopreservação (Pickett et al., 1975; Varner et al., 1987; Jasko, 1991). Entretanto, é justamente no plasma seminal que está a maior parte dos antioxidantes do sêmen, já que o espermatozóide é desprovido de quantidades suficientes destes agentes (Baumber et al., 2005). Com isso a centrifugação, descrita como um processo gerador de espécies reativas de oxigênio (Twigg et al., 1998; Baumber et al., 2005), e a retirada do plasma seminal são, ao mesmo tempo necessárias e de grande risco para a viabilidade dos gametas.

As atividades das enzimas não tiveram diferença significativa ($p > 0,05$) entre o sêmen diluído e congelado. Conseqüentemente, pode-se supor que o efeito da suplementação de enzimas antioxidantes ao diluente não será prejudicado pelo estresse sofrido na congelação.

Foi observada apenas atividade de GPx no diluente comercial utilizado (Tabela 1) no experimento. Não foi verificada atividade para as enzimas CAT e SOD, o que demonstra que o diluente não proporcionou a compensação esperada na perda das defesas antioxidantes enzimáticas causada pela retirada do plasma seminal. Kankofer et al., (2005), investigando as atividades das mesmas enzimas no sêmen eqüino resfriado, descreveram um aumento das atividades enzimáticas após a diluição do sêmen com diluente a base de leite desnatado (EquiPro, Minitüb, Tiefenbach, Alemanha). Os

autores sugerem que este aumento ocorreu devido a interações entre as enzimas do plasma seminal e os componentes do diluente.

5.3 Atividade antioxidante não enzimática

O método utilizado avalia o potencial antioxidante total de agentes antioxidantes não enzimáticos como α -tocoferol, ácido ascórbico, ácido úrico, glutatona, piruvato, taurina, hipotaurina e albumina.

A metodologia empregada neste estudo foi pioneira na avaliação de antioxidantes não enzimáticos em animais. Alguns estudos realizados em humanos avaliaram a ação desses antioxidantes, inclusive através do mesmo método. Os níveis de antioxidantes não enzimáticos encontrado no sêmen de homens férteis foram superiores aos encontrados no sêmen de inférteis (Smith et al., 1996). Porém, nenhum estudo foi realizado observando esta atividade no sêmen congelado, nem mesmo refrigerado.

Os valores obtidos com a avaliação das defesas antioxidantes não enzimáticas foram semelhantes no sêmen equino fresco, diluído e congelado, o que indica que o estresse sofrido no processamento e na congelação não afetou os níveis antioxidantes dessas defesas.

Foi demonstrado no sêmen fresco humano que os antioxidantes não enzimáticos retardam ou previnem a oxidação espermática, podendo ser responsáveis pela preservação da membrana e possuindo um efeito inibidor da peroxidação lipídica *in vitro* (Agarwal et al., 2004).

Desta forma, pode-se supor que a adição destes compostos ao sêmen poderia conferir maior preservação das propriedades da membrana

espermática durante o processo da congelação, acarretando melhores resultados na qualidade do sêmen pós-descongelação. Entretanto, diversas pesquisas têm descrito resultados contraditórios. Agarwal et al. (2004) realizaram uma ampla revisão da literatura abordando os tratamentos da infertilidade do homem à base de antioxidantes. Diversos estudos utilizaram suplementação oral, enquanto outros adicionaram tanto agentes enzimáticos quanto não enzimáticos nas preparações espermáticas. Algumas pesquisas descreveram melhora nos parâmetros espermáticos (motilidade, concentração e morfologia), contudo, os autores ressaltam que diversos fatores tornam estes resultados frágeis, como por exemplo, as variadas patologias dos pacientes (varicocele, azoospermia, astenozoospermia, teratozoospermia), as diferentes concentrações e o tempo de tratamento estudados.

Em eqüinos, a adição de ácido ascórbico (10 mM) e α -tocoferol (25, 50, 100 ou 500 μ M) ao diluente de sêmen eqüino para congelação não aumentou a motilidade, a preservação do DNA, a integridade acrossomal e nem a viabilidade pós-descongelação (Baumber et al., 2005). Resultados similares foram obtidos com a adição dos mesmos antioxidantes no sêmen eqüino mantido sob refrigeração (Ball et al., 2001). Aurich et al. (1997) observaram um efeito protetor do ácido ascórbico na integridade da membrana dos espermatozóides eqüinos resfriados, verificando, por outro lado, um efeito prejudicial na motilidade progressiva.

Como a adição desses antioxidantes não enzimáticos ao sêmen eqüino criopreservado não demonstrou nenhum benefício na qualidade do sêmen, foi sugerido que os danos espermáticos sofridos durante a

criopreservação podem ser resultado de outro mecanismo que não o estresse oxidativo (Baumber et al., 2005), o que talvez explique a constância de comportamento das defesas antioxidantes não enzimáticas encontradas em nosso estudo no sêmen eqüino fresco, diluído e congelado. Além disso, outro fato que corrobora com a observação de Baumber et al., (2005) é que não foram observadas correlações entre os sistemas de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos com as características do sêmen.

A avaliação do diluente FR-5 mostrou uma pequena capacidade antioxidante não enzimática, o que pode ser explicado pela sua constituição. A presença da gema de ovo e leite no diluente pode provê-lo de variados compostos com ação antioxidante, compostos esses que podem ter colaborado na reposição das defesas não enzimáticas perdidas com a retirada de grande parte do plasma seminal.

5.4 Lipoperoxidação

A lipoperoxidação do sêmen eqüino foi investigada através da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), entretanto foi observada uma interferência do diluente na técnica. A avaliação de TBA-RS do diluente de congelação FR-5 (controle negativo) apresentou valor semelhante aos observados para o sêmen diluído e congelado. Diversos compostos podem induzir uma falsa leitura de malondialdeído na amostra, dentre eles diversos açúcares (Stradaioli & Magistrini, 2002). Além da glicose, frutose e rafinose, o diluente utilizado neste trabalho continha gema de ovo, o

que acarreta o acréscimo de inúmeras substâncias que alteram a leitura do espectrofotômetro. Além disso, os lipídios da gema já podem estar peroxidados no momento da elaboração do diluente. Stradaioli & Magistrini (2002) descreveram essa interferência do diluente na determinação da lipoperoxidação, recomendando a lavagem dos espermatozoides antes do ensaio para quantificação de malondialdeído na amostra. Porém, para que as células sejam eficientemente lavadas e separadas de açúcares e lipídios provenientes do diluente, seriam necessárias no mínimo três centrifugações e ressuspensões. Este procedimento acarretaria um aumento na geração de ROS, que também prejudicaria a técnica.

Apesar da clara interferência do diluente no experimento, foi observada uma coerência entre os resultados da lipoperoxidação e as enzimas antioxidantes, embora não havendo correlação significativa ($p > 0,05$). A mensuração das TBA-RS demonstrou uma menor lipoperoxidação no sêmen fresco, em relação ao sêmen diluído e o sêmen congelado, não havendo diferença entre esses últimos. Foram verificados valores mais elevados para a atividade das três enzimas no sêmen fresco e, conseqüentemente, uma menor peroxidação da membrana plasmática dos espermatozoides ocorreu (Figura 15

Foi verificada uma correlação negativa média ($r = -0,62$) e significativa ($p < 0,01$) entre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a motilidade total, bem como entre as TBA-RS e a motilidade progressiva ($r = -0,61$; $p < 0,05$). Desta forma, quando aumenta a lipoperoxidação diminui a motilidade espermática (Figuras 17 e 18), o que está de acordo com o observado por Sharma & Agarwal (1996) e Baumber et al (2000). Entretanto,

apenas 38% e 36% do aumento da lipoperoxidação podem explicar a diminuição da motilidade total e progressiva, respectivamente.

6. CONCLUSÕES

- Os garanhões que apresentaram a maior percentagem de células móveis pós-descongelamento nem sempre foram aqueles que obtiveram as melhores taxas de motilidade no sêmen fresco.
- O estresse sofrido no processamento (centrifugação e diluição) do sêmen eqüino diminuiu as defesas antioxidantes enzimáticas.
- O diluente utilizado para a congelação do sêmen eqüino não proporcionou a compensação esperada na perda das defesas antioxidantes enzimáticas.
- O estresse sofrido no processamento (centrifugação e diluição) e congelação do sêmen não afetou as defesas antioxidantes não enzimáticas.
- A qualidade do sêmen eqüino congelado não teve associação com as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas.

- A queda na motilidade do sêmen congelado pode ser parcialmente explicada pelo aumento da peroxidação dos lipídios do sêmen.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase. **Meth. Enzymol.**, Nova York, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALVARENGA, M. A., ONOE, E., FONSECA, H. Utilização da inseminação artificial por endoscopia na aplicação do sêmen congelado de garanhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 14., Belo Horizonte, 2001. **Anais...** Belo Horizonte, 2001. p. 361-362.
- AGARWAL, A.; HAMAMAH, S.; SHERARRIZ, M. Péroxidation et pouvoir fécondant du spermatozoïde. **Périsconceptologie**, Paris, v. 22, p. 327-330, 1994.
- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil. Steril.**, Los Angeles, v. 79, p. 829-843, 2003.
- AGARWAL, A.; NALLELLA, K. P.; ALLAMANENI, S. S. R.; SAID, T. M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reprod. Biomed. Online**, Cambridge, v. 8, p. 616-627, 2004.
- AGARWAL, A.; SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU Internat**, Londres, v. 95, p. 503-507, 2005.
- AMMAN, R. P. Fertility of cryopreserved sperm. **Contr. Fertil. Sex.**, Paris, v. 19, p. 946-954, 1991.
- AMMAN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Filadelfia: Lea & Febiger, 1992. p. 715-745..
- AMMAN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equi. Vet. Sci.**, Nova York, v. 7, p. 145-174, 1987.

- AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; WEST, K. M. Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminal- and lucigenin-dependent chemiluminescence. **J. Cell Physiol.**, Bethesda, v. 151, p. 466-477, 1992.
- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, dna damage and the Y chromosome. **Reproduction**, Cambridge, v. 1, p. 497-0, 2001.
- AURICH, J. E.; KUHNE, A.; HOPPE, H. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, Nova York, v. 46, p. 791-797, 1996.
- AURICH, J. E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, Nova York, v. 48, p. 185-192, 1997.
- BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Cryopreservation alters the Ca⁺⁺ flux of bovine spermatozoa. **Can. J. Anim. Sci.**, Ottawa, v. 74, p. 45-51, 1994.
- BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; BAUMBER, J.; LIU, I. K. Catalase activity in equine semen. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v. 61, p. 1026-1030, 2000.
- BALL, B. A.; VO, A. T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v. 62, p. 508-515, 2001.
- BALL, B. A.; VO, A. T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. **J. Androl.**, Philadelphia, v. 23, p. 259-269, 2002.
- BARKER, C. A. V.; GANDIER, J. C. C. Pregnancy in a mare resulting from epididymal spermatozoa. **Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.**, Gardenvale, v. 21, p. 47-51, 1957.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. C. G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **J. Androl.**, Philadelphia, v. 21, p. 895-902, 2000.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **J. Androl.**, Philadelphia, v. 24, p. 621-628, 2003.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **Am. J. Vet. Res.**, Chicago, v. 66, p. 772-779, 2005.

- BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, Berkeley, v. 65, p. 1865-1874, 1999.
- BILODEAU, J. F.; CHATEERJEE, S.; SIRRARD, M. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Mol. Reprod. Dev.**, Nova York, v. 55, p. 282-288, 2000.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem. J.**, Londres, v. 134, p. 707-716, 1973.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina**, Buenos Aires, v. 58, p. 350-356, 1998.
- CHATEERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing freezing and thawing. **Mol. Reprod. Dev.**, Nova York, v. 59, p. 451-458, 2001.
- COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 111, p. 918-931, 1989.
- COTTORELLO, A. C. P. **Criopreservação de sêmen eqüino utilizando associação de etilenoglicol e glicerol**. 2002. 105 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- COMBES, G. B.; VARNER, D. D.; SCHROEDER, F. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 56, p. 127-132, 2000.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in inhibition of sperm motility. **J. Androl.**, Philadelphia, v. 13, p. 379-386, 1992.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Hum. Reprod.**, Oxford, v. 10, p. 15-21, 1995.
- DELL'ÁQUA JÚNIOR, J. A.; PAPA, F. O.; ZAHN, F. S. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 26, p. 189-191, 2002.
- EDDY, E. M. The spermatozoon. In: KNOBIL, E. **The physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1988. p. 27-68.

- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Meth. Enzymol.** Nova York, v. 186, p. 407-421, 1990.
- GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóide e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. **Reprodução Animal**. 6 ed. São Paulo: Manole, 1995, p. 167-190.
- GÖTZE, R. **Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere**. Hannover: Scharper Verlag, 1949.
- GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **Int. J. Androl.**, Copenhagen, v. 20, p. 61-69, 1997.
- GUERRA, M. M. P.; EVANS, Gareth ; MAXWELL, W. M. C. . Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 28, p. 187-195, 2004.
- HAFEZ, E. S. E. Eqüinos. In: HAFEZ, E. S. **Reprodução Animal**. 6 ed. São Paulo: Manole, 1995. p. 366-389.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **J. Androl.**, Philadelphia, v. 11, p. 73-88, 1990.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. New York: Oxford University Press, 1999.
- HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs & Aging**, Auckland, v. 18, p. 685-716, 2001.
- HARKEMA, W.; BOYLE, M. S. Use of fluorescent stains to assess membrane integrity of equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12., Den Haag, 1992. **Proceedings...**, Den Haag, 1992. p. 1424-1426.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, Nova York, v. 88, p. 343-352, 1990.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 62, p. 3-22, 2000.
- JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Vet.**, Jaboticabal, v. 10, p. 156-165, 1994.
- JERVIS, K. M.; ROBAIRE, B. Dynamic changes in gene expression along the

- rat epididymis. **Biol. Reprod.**, Nova York, v. 65, p. 696-703, 2001.
- JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. J. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effect of fatty acids peroxides and protective action of seminal plasma. **Fertil. Steril.**, Nova York, v. 31, p. 531-537, 1979.
- KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**, Nova York, v. 63, p. 1354-365, 2005.
- KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HÖTT, A.; VIEIRA, M.J.; MATTOS, R.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 68, p. 318-319, 2001.
- KENNEY, R.M.; HURTTGEN, J.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion**. Hastings- E.U.A.: Society for Theriogenology, 1983.
- KIRK, E. S.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 68, p. 317-318, 2001.
- KLUG, E. **Untersuchungen zur klinischen Andrologie des Pferdes – die Bedeutung andrologischer Befunde am Hengst für den Zuchteinsatz**. 1982. 101 f. Tese (Livro Docência em Medicina Veterinária) - Escola Superior de Veterinária, Hannover, Alemanha, 1982.
- KNEISSL, S. **Tiefgefrierkonservierung von PferdeSperma: Einfluss der Samen- entnahmetechnik, zentrifugation, konfektionierungsform und Einfriermethode auf die Motilität und Membranintegrität der Samenzellen**. 1993. 85 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola Superior de Veterinária, Hannover, Alemanha, 1993.
- KOPF, G. S.; WOOLKALIS, M. J.; GERTON, G. L. Evidence for a guanine nucleotide-binding regulatory protein in invertebrate and mammalian sperm. Identification by islet-activating protein-catalyzed ADP-ribosylation and immunochemical methods. **J. Biol. Chem.**, São Francisco, v. 261, p. 7327-7331, 1986.
- LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. Preservação do Sêmen fresco equino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 26, n. 1, p. 2942, 1998.
- LAGARES, M. A.; AMARAL, D. C. G.; SOUZA, P. C. Efeito de diluidores e

- curvas de resfriamento sobre a motilidade e integridade da membrana plasmática do espermatozóide eqüino criopreservado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 14, Belo Horizonte, 2001. **Anais...** Belo Horizonte, 2001. p. 452-453.
- LEWIS, S. E. M.; STERLING, E. S. L.; YOUNG, I. S. Comparision of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertil. Steril.**, Los Angeles, v. 67, p.142-147, 1997.
- LIMA, R. A. S. A eqüideocultura está em transformação. E você? **Rev. Bras. Med. Equi.**, São Paulo, v.1, p.20-22, 2005.
- LISSI, E., PASCUAL, C., DEL CASTILLO, M.D. Luminol luminescence indeuced by 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Rad. Res. Comm.**, Nova York, v. 17, p. 299-311, 1992.
- LOMEO, A. M.; GIAMBERSIO, A.M. Water test: A simple method to asses sperm-membrane integrity. **Int. J. Andr.**, Copenhagen, v. 14, p. 278-282, 1991.
- LOOMIS, P. R.; AMANN, R. P; SQUIRES, E. L., Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. **J. Anim. Sci.**, São Francisco, v. 56, p. 687-693, 1983.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, W.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, São Francisco, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAGESTRINI, M.; MCDONNELL, SUE. M.; SEGUIN, F.; BEAU, P.; PALMER, E. Analysis of Sex gland markers in equine seminal plasma of in copula and ex copula-induced ejaculates: Quantification by magnetic resonance spectroscopy. INTERNATIONAL WORKSHOP ON ERECTION AND EJACULATION IN HORSES AND MEN, 2., 1996, Nouzilly. **Proceedings...**, Nouzilly, 1996. p. 45-53.
- MANN, T. Biochemistry of stallion semen. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 23. p. 47-52.1975.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproduction and semen**. New York: Springer Verlag, 1981. p. 23-28.
- MATTOS, R. **Influência de diferentes métodos de preservação de semen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana**. 1995. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do rio Grande do Sul, 1995.

- MARKLUND, S. **Handbook for Oxygen Radical Research**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 243-247.
- MARTIN, J. C., KLUG, E., GÜNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, Cambridge, v. 27, p. 47-51, 1979.
- MAXWELL, S. R. J. Prospects for the use of antioxidant therapies. **Drugs**, Nova York, v. 49, p. 345-361, 1995.
- McKINNON, A. O. Artificial insemination of cooles transported and frozen sêmen. **Austral. Equi. Vet.**, Sydney, v. 14, p. 156-175, 1996.
- MCKINNON, A. O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, 3 ed. Filadelfia: Lea & Febiger, 1992. p. 1322.
- NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGÜERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, Nova York, v. 51, p. 721-727, 1999.
- NEILD, D. M.; GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B.; AGÜERO, A.; BROUWERS, J. F. H. M. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, Nova York, v. 58, p. 295-298, 2002.
- NISHIKAWA, Y. Studies on the preservation of raw and frozen horse semen. . **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, Cambridge, v. 23, p. 99-104, 1975.
- OSCHENDORF, F. R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Hum. Reprod. Update**, Oxford, v. 5, p. 399-420, 1999.
- O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M. T. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **Int. J. Androl.**, Copenhagen, v. 26, p. 109-114, 2003.
- PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; SOUZA, D. B. Effect of extender osmolarity and cooling to 5°C on motility and membrane integrity of equine frozen spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 68, p. 343-344, 2001.
- PAPA, F. O.; ZAHN, F. S.,; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A. Utilização do diluente MP 50 para a criopreservação de sêmen eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 26, p. 184-187, 2002.
- PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R. Relationship between oxidative stress, semen characteristics and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigations. **Fertil. Steril.**, Los Angeles, v. 73, p. 459-464, 2000.

- PICKETT, B. W., SULLIVAN, J. J., BYERS, W. W. Effects of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertil. Steril.**, Los Angeles, v. 26, p. 167-174, 1975.
- PICKETT, B. W., AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. IN: McKINNON, A. O; VOSS, J. L. (Eds.) **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 769-789.
- POLGE, C.; ROWSON, L. E. A.; Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79°C. **Nature**, Nova York, v. 169, p. 626, 1952.
- RICE-EVANS, C.; BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Prog. Lipid. Res.**, Oxford, v. 79, p. 71-110, 1993.
- RIVLIN J.; MENDEL J.; RUBINSTEIN S.; ETKOVITZ N.; BREITBART H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biol. Reprod.**, Nova York, v. 70, p. 518-522 , 2004.
- ROBERTSON, L.; WATSON, P. F. Calcium transport in diluted or cooled ram sperm. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v. 77, p. 177-185, 1986.
- SAILLING, P. M.; IRONS, J.; WAIBEL, R. Mouse sperm antigens that participate in fertilization, I. Inhibition of sperm fusion with the egg plasma membrane using monoclonal antibodies. **Biol. Reprod.**, Nova York, v. 33, p. 515-526, 1985.
- SAILLING, P. M. Mouse sperm antigens that participate in fertilization. IV. A monoclonal antibody prevents zona penetration by inhibition of the acrosome reaction. **Dev. Biol.**, Nova York, v. 117, p. 511-519, 1986.
- SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **J. Androl.**, Philadelphia, v. 23, p. 737-752, 2002.
- SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. 306p.
- SANOCKA, D.; MIESEL, R.; JEDRZEJCZAK, P.; CHEMONSKA-SOYTA, A. C.; KURPISZ, M. Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility. **Int. J. Androl.**, Copenhagen, v. 20, p. 255-264, 1997.
- SCHMITT, F. L. **A concentração, a composição e a qualidade do plasma seminal na preservação do sêmen eqüino a +4°C**. 2002 98 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, Ottawa, v. 48, p. 838-850, 1996.

SHARMA, R. K.; PASQUALOTTO, F. F.; NELSON, D.R. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Hum. Reprod.**, Oxford, v. 14, p. 2801-2807, 1999.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **J. Androl.**, Philadelphia, v. 25, p. 5-18, 2004.

SMITH, R; VANTMAN, D.; PONCE, J.; ESCOBAR, J.; LISSI, E. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. **Hum. Reprod.**, Oxford, v. 11, p.1655-1660, 1996.

SNOECK, P.P.N. **Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade.** 2003. 139 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

STRADAIOLI, G.; MAGISTRINI, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for determination of malondialdehyde in equine spermatozoa. **Theriogenology**, Nova York, v. 58, p. 347-350, 2002.

TWIGG, J.; IRVINE, D. S.; HOUSTON, P. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. **Mol. Hum. Reprod.**, Nova York, v. 4, p. 439-445, 1998.

VALCÁRCEL, A.; DE LASH ERAS, M. A.; PEREZ, L. Fluorescent stain as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, Nova York, v. 41, p. 483-489, 1994.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. ; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, Nova York, v. 28, p. 709-723, 1987.

WANG, X.; SHARMA, R. K.; SIKKA, S. C. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertil. Steril.**, Los Angeles, v. 80, p. 531-535, 2003.

WARD, R. J.; PETERS, T. J. Free Radicals. In: MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. (Ed.). **Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.** New

York: Churchill Livingstone, 1995. p. 765-777.

WATSON, P. F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessments of their post-thawing function. **Reprod. Fert. Dev.**, Londres, v. 7, p. 781-891, 1995.

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

WATSON, P. F.; DUNCAN, A. E. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. **Cryobiology**, Nova York, v. 25, p. 131-142, 1988.

WENDEL A. Glutathione peroxidase. **Meth. Enzymol.**, Nova York, v. 77, p. 325-332, 1981.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, Ottawa, v. 55, p. 922, 926, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Valores da motilidade total, da motilidade progressiva e do vigor do sêmen fresco dos garanhões.

Garanhão	Coleta	MT (%)	MP (%)	Vigor (1-5)
A	1	80	65	4
A	2	90	70	4
A	3	80	70	4
B	1	80	65	4
B	2	90	85	5
C	1	70	55	4
C	2	55	40	3
C	3	70	55	4
D	1	35	20	3
D	2	30	15	2
E	1	90	80	5
E	2	90	80	5
E	3	90	75	4
F	1	65	45	3
F	2	55	35	3

MT: motilidade total; MP motilidade progressiva

APÊNDICE 2 - Valores da motilidade total, da motilidade progressiva, do vigor, da integridade e da funcionalidade da membrana no sêmen congelado dos garanhões.

Garanhão	Coleta	MT (%)	MP (%)	Vigor (1-5)	INT	HOS
A	1	20	10	3	23	8
A	2	30	20	3	51	4
A	3	30	20	3	20	11
B	1	30	20	3	3	20
B	2	40	30	3	9	20
C	1	10	5	2	21	17
C	2	10	5	2	14	19
C	3	25	10	2	19	3
D	1	25	10	3	0	40
D	2	10	5	2	15	41
E	1	60	50	4	26	51
E	2	45	30	3	35	20
E	3	65	45	4	26	51
F	1	10	5	2	14	22
F	2	20	10	3	15	36

MT: motilidade total; MP motilidade progressiva; INT: integridade da membrana; HOS: funcionalidade da membrana.

APÊNDICE 3 – Atividade da enzima catalase por ejaculado. Valores expressos em unidades de catalase/mg de proteína.

Ejaculados	Tratamentos		
	Sêmen fresco	Sêmen diluído	Sêmen congelado
1	31,319	3,235	2,840
2	11,304	2,052	2,660
3	43,087	1,339	1,287
4	5,770	1,857	1,217
5	9,557	2,940	2,567
6	27,760	7,619	7,867
7	34,362	2,228	2,320
8	6,819	4,346	4,057
9	9,143	8,182	11,427
10	47,826	5,194	3,666
11	6,222	12,970	13,602
12	*	5,814	4,477
13	21,369	4,483	2,963
14	30,836	2,006	2,626
15	21,972	4,492	3,308

APÊNDICE 4 - Atividade da enzima SOD por ejaculado. Valores expressos em unidades de SOD/mg de proteína.

Ejaculados	Tratamentos		
	Sêmen fresco	Sêmen diluído	Sêmen congelado
1	0,00	3,95	0,00
2	0,79	1,82	0,00
3	0,00	0,00	0,00
4	8,04	0,00	1,66
5	4,36	0,00	0,00
6	7,62	0,00	0,00
7	1,35	0,00	0,00
8	7,92	0,00	0,00
9	8,85	0,13	0,00
10	3,52	1,73	0,00
11	38,33	2,29	0,00
12	*	1,96	1,39
13	4,13	0,66	0,00
14	15,09	1,67	0,00
15	16,26	0,00	0,00

APÊNDICE 5 - Atividade da enzima GPx por ejaculado. Valores expressos em unidades de GPx/mg de proteína.

Ejaculados	Tratamentos		
	Sêmen fresco	Sêmen diluído	Sêmen congelado
1	16,833	4,626	4,437
2	7,747	4,059	8,968
3	19,926	7,167	8,101
4	12,601	10,261	9,237
5	7,473	*	3,827
6	9,643	15,173	6,499
7	8,226	5,915	5,669
8	7,987	6,867	7,001
9	12,047	8,205	3,689
10	24,253	3,975	6,674
11	14,433	8,850	6,309
12	*	8,696	6,924
13	13,486	6,454	5,003
14	14,217	4,703	9,510
15	9,614	6,649	*

APÊNDICE 6 – Potencial antioxidante total por ejaculado. Valores expressos em nmol de Trolox/mg de proteína.

Ejaculados	Tratamentos		
	Sêmen fresco	Sêmen diluído	Sêmen congelado
1	16,833	4,626	4,437
2	7,747	4,059	8,968
3	19,926	7,167	8,101
4	12,601	10,261	9,237
5	7,473	*	3,827
6	9,643	15,173	6,499
7	8,226	5,915	5,669
8	7,987	6,867	7,001
9	12,047	8,205	3,689
10	24,253	3,975	6,674
11	14,433	8,850	6,309
12	*	8,696	6,924
13	13,486	6,454	5,003
14	14,217	4,703	9,510
15	9,614	6,649	*

APÊNDICE 7 – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Valores expressos em nmol de TBA-RS/mg de proteína.

Ejaculados	Tratamentos		
	Sêmen fresco	Sêmen diluído	Sêmen congelado
1	0,418	6,920	6,236
2	0,537	4,345	5,194
3	1,037	6,465	3,567
4	0,228	5,281	5,509
5	0,614	8,680	4,848
6	0,855	5,760	6,117
7	0,359	5,322	5,993
8	0,628	5,211	4,419
9	0,292	4,696	7,129
10	0,517	5,210	5,369
11	0,351	3,523	4,054
12	*	3,843	4,027
13	0,245	3,068	4,220
14	0,467	3,926	6,130
15	0,754	3,464	4,302

APÊNDICE 8 - Correlações (Coeficiente de correlação de Pearson) da motilidade espermática, atividade da catalase (CAT), atividade da glutatona peroxidase (GPx), capacidade antioxidante total (TRAP) e peroxidação lipídica (TBA-RS) no sêmen eqüino fresco.

	MT	MP	CAT	GPx	SOD	TRAP	TBA-RS
M T		0,984	-0,345	-0,289	-0,130	0,435	-0,013
M P			-0,357	-0,249	-0,135	0,459	0,005
CAT				0,511	-0,485	0,039	0,384
GPx					-0,212	0,524	0,006
SOD						-0,504	-0,205
TRAP							-0,060
TBA-RS							

APÊNDICE 9 - Correlações (Coeficiente de correlação de Pearson) da motilidade espermática, integridade de membrana, funcionalidade de membrana, atividade da catalase (CAT), atividade da glutatona peroxidase (GPx), capacidade antioxidante total (TRAP) e peroxidação lipídica (TBA-RS) no sêmen eqüino congelado.

	MT	MP	Integ.	Func.	CAT	GPx	SOD	TRAP	TBA-RS
M T		0,978	0,306	0,428	0,169	-0,207	0,195	0,314	-0,621^a
M P			0,322	0,448	0,163	-0,151	0,177	0,265	-0,605^a
Integ				-0,251	0,036	0,283	-0,043	-0,055	-0,358
Func.					0,467	-0,344	-0,107	0,321	-0,098
CAT						-0,427	-0,262	0,137	0,086
GPx							0,035	-0,023	0,035
SOD								-0,156	-0,139
TRAP									-0,258
TBA-RS									

^a p < 0,01.

APÊNDICE 10 – Análise de variância – Comparação da atividade da catalase nos tratamentos fresco, diluído e congelado.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	5	5,3402	1,068	2,68	0,037
Garanhão	2	23,7658	11,8829	29,79	***
Erro	36	14,3609	0,3989		
Total	43				

GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.

APÊNDICE 11 - Análise de variância – Comparação da atividade da SOD nos tratamentos fresco, diluído e congelado.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	5	0,81173	0,16235	1,82	0,134
Garanhão	2	4,02794	2,01397	22,54	***
Erro	36	3,21637	0,08934		
Total	43				

GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.

APÊNDICE 12 - Análise de variância – Comparação da atividade da GPx nos tratamentos fresco, diluído e congelado.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	5	14,22	2,84	0,21	0,958
Garanhão	2	324,73	162,37	11,74	***
Erro	34	470,32	13,83		
Total	41				

GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.

APÊNDICE 13 - Análise de variância – Comparação dos valores do ensaio TRAP nos tratamentos fresco, diluído e congelado.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	5	8,5755	1,7151	4,45	0,003
Garanhão	2	2,1339	1,067	2,77	0,076
Erro	39	13,8727	0,3854		
Total	43				

GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.

APÊNDICE 14 - Análise de variância – Comparação dos valores de TBA-RS nos tratamentos fresco, diluído e congelado.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	5	1,1899	0,238	2,4	0,056
Garanhão	2	53,9732	26,9866	272,43	***
Erro	36	3,5661	0,0991		
Total	43				

GL: graus de liberdade; SQ: soma de quadrados; QM: quadrado médio.

VITA

Ivan Cunha Bustamante Filho, filho de Ivan Cunha Bustamante e de Nádia Gomes Bustamante, nasceu em 06 de abril de 1979, no Rio de Janeiro, RJ.

Estudou no Liceu Franco-Brasileiro no Rio de Janeiro, onde em 1994 completou o ensino fundamental. No Colégio Santo Antônio Maria Zaccaria, também no Rio de Janeiro, cursou o ensino médio. Foi aprovado em 4º lugar para cursar Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes, RJ, iniciando a graduação em março de 1999. Durante o curso, foi bolsista de iniciação científica no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual e do Laboratório de Melhoramento Genético Animal e bolsista de trabalho, atuando no Setor de Cirurgia do Hospital Veterinário da Universidade. Graduou-se Médico Veterinário em abril de 2004, já aprovado para cursar o mestrado acadêmico em Zootecnia – Produção Animal, Área de concentração Reprodução Animal.

Em janeiro de 2006, foi aprovado em 1º lugar no processo seletivo para o curso de Doutorado no mesmo Programa de Pós-graduação.