

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CONCEPÇÃO DE NOVILHAS *BOS INDICUS* UTILIZANDO SÊMEN
CRIOPRESERVADO COM ANTIOXIDANTE E IGF-1**

Diego Santos Almeida

São Luís
2015

Diego Santos Almeida

Concepção de novilhas *Bos indicus* utilizando sêmen criopreservado com antioxidante e IGF-1

Qualificação apresentada à Escola de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão como requisito parcial para defesa.

Área de Concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Fernando Andrade Souza

São Luís
2015

Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFAC

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Taxa de concepção de novilhas *Bos indicus* utilizando sêmen criopreservado com antioxidante e fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1**”, processo número **23107.009836/2015-71** e protocolo número **49/2015** sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Andrade Souza, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Acre e foi aprovada em reunião de **23/07/2015**.

We certify that the research “**Taxa de concepção de novilhas *Bos indicus* utilizando sêmen criopreservado com antioxidante e fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1**” process number **23107.009836/2015-71** and protocol number **49/2015** under the responsibility of Prof. Dr. Fernando Andrade Souza, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by the “Animal Ethic Committee” of the Federal University of Acre and was approved in the meeting of day **23/07/2015**.

Rio Branco-Acre, 23 de julho de 2015.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Henrique', is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Henrique Jorge de Freitas
Coordenador CEUA/UFAC
Portaria nº670 de 06 de março de 2015

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	06
	LISTA DE GRÁFICOS	07
	LISTA DE ANEXOS.....	08
1	INTRODUÇÃO.....	09
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	10
	2.1 Criopreservação espermática	10
	2.2 Ação dos diluidores sobre a criopreservação.....	13
	2.3 Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e estresse oxidativo.....	15
	2.4 Antioxidante.....	20
	2.5 Glutathiona	22
	2.6 Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1).....	25
3	HIPÓTESE.....	28
4	OBJETIVOS.....	28
	4.1 Objetivo Geral.....	28
	4.2 Objetivos Específicos.....	28
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
	5.1 Local	28
	5.2 Animais.....	28
	5.3 Delineamento experimental	28
	5.4 Coleta e análise do sêmen pré-criopreservação	29
	5.5 Criopreservação do sêmen	30
	5.6 Análise do sêmen pós-criopreservação	32
	5.6.1 Análise da morfologia espermática.....	32
	5.6.2 Análises da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial.....	32
	5.7 Avaliação da fertilidade do sêmen: inseminação e taxa de concepção.....	33
	5.8 Análise Estatística.....	34
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
	6.1 Análises preliminares	34
	6.2 Análises após a criopreservação	35
	a. Motilidade e Vigor	35
	b. Morfologia	37
	c. Teste de Termorresistência Rápido	38
	d. Avaliação das membranas	40
	e. Estresse Oxidativo	42

f. Taxa de gestação	44
7. CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise subjetiva inicial do sêmen dos touros Nelore alocados no experimento.....	34
Tabela 2	Motilidade e vigor após a criopreservação.....	35
Tabale 3	Defeitos maiores e menores após a criopreservação.....	36
Tabela 4	Avaliação da motilidade no momento 0', 10', 20' e 30' do TTRr entre os tratamentos.....	38
Tabela 5	Avaliação da motilidade nos quatro momentos do TTRr dentro de cada tratamento.....	39
Tabela 6	Quantidade de espermatozoides com membrana acrossomal e plasmatica intacta.....	40
Tabela 7	Espermatozoides com e sem estresse oxidativo nos diferentes tratamentos.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Protocolo para inseminação artificial em tempo fixo. P4: progesterona; BE: benzoato de estradiol; PGF2a: prostaglandina F2-alfa; ECP: cipionato de estradiol; eCG: gonadotropina coriônica equina; GnRH: hormônio liberador de gonadotropina.....	34
Gráfico 2	Diagnóstico de gestação nos diferentes tratamentos.....	44

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Composição do diluidor TRIS/GEMA a 20%>>.....	34
---------	---	----

1. INTRODUÇÃO

O efetivo bovino brasileiro está estimado em 205.260.154 cabeças, estando à região Nordeste com 13,8% desse total, 28,3 milhões de cabeças, onde o efetivo de animais da raça Nelore (*Bos indicus*) se destaca sobre as demais (IBGE, 2009).

Assim, o Brasil possui um dos maiores rebanhos bovinos comerciais do mundo, destacando-se não somente pelo tamanho, mas pelo potencial de crescimento. O que propicia maior taxa de exportação de carne. Um dos principais motivos para esta crescente difusão, é a disponibilidade de recursos naturais associados com incrementos de conhecimentos nutricionais e genéticos aliados ao manejo, possibilitando o emprego de biotecnologias aplicadas à reprodução animal, como a Inseminação Artificial (IA) e a criopreservação espermática.

Com a evolução da aplicação das principais biotecnologias, é importante ressaltar o papel da IA, sendo a primeira biotecnologia adotada nos sistemas de produção animal brasileiro, visando à disseminação do material de alto valor genético de touros para diversas regiões do Brasil (Renesto, 2004).

Porém, para que ocorra uma resposta melhor da IA, vários estudos vem sendo direcionados a criopreservação espermática, por ser caracterizada como um processo de grande estresse celular, devido à diluição do sêmen, comumente utilizada, promover a redução da concentração de antioxidantes e hormônios, resultando no desequilíbrio entre oxidantes, antioxidantes e hormônios, e, conseqüentemente, no estresse celular e diminuição da motilidade, impondo aos espermatozoides condições extremamente desfavorável à manutenção de sua viabilidade (Bilodeau et al., 2000).

O grande fator que influencia o processo de criopreservação é o plasma seminal, por ser um fluido com papel essencial para as funções espermáticas *in vivo*, desde a ejaculação até a fecundação (Kraus et al., 2005). Dentre os hormônios presentes neste meio, destacam-se o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1), por apresentar papel primordial na estrutura e motilidade espermática, favorecendo a fecundação (Ahima et al., 2000; Tena-Sempere e Barreiro, 2002).

As funções testiculares do IGF-1 parecem ser servidas pela sua produção local, sem uma contribuição endócrina. O IGF-1 testicular tem um papel determinante no desenvolvimento e diferenciação das células de Leydig e das células germinativas, a falta dessa substância nos testículos pode induzir infertilidade, uma vez que atua tanto na preservação da membrana plasmática da célula espermática, como na sua motilidade (Gnessi et al., 1997).

Outros constituintes do plasma seminal que possuem grande relevância são os antioxidantes, como a glutatona, que tem como função a diminuição do aparecimento de injúrias ocasionadas aos espermatozoides com a formação da peroxidação lipídica das membranas (Jones e Mann, 1977), causada pelo estresse oxidativo devido à produção excessiva de radicais livres, os quais estão associados com o declínio da fertilidade do sêmen, após o período de estocagem (Maxwell e Watson, 1996). Segundo Neagu et al. (2010) o uso de sêmen associado à adição de antioxidantes podem inibir ou diminuir a produção de radicais livres oriundos de reações oxidativas, promovendo um aumento da viabilidade espermática.

Buscando melhora na preservação da integridade celular, a associação de componentes antioxidantes e hormônios tem sido utilizada nos meios de congelamento de sêmen de várias espécies inclusive, a bovina, no intuito de reduzir essas alterações causadas à membrana dos espermatozoides (Beconi et al., 1993)

Assim, faz-se necessário delinear experimentos que permitam estudar, numa mesma condição, os mecanismos biológicos envolvidos na criopreservação espermática com antioxidantes associados com hormônios, de modo a aplicá-los de maneira racional objetivando alcançar melhor desempenho nos programas reprodutivos, contribuindo com o desenvolvimento tecnológico regional e mundial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criopreservação espermática

A criobiologia consiste de uma das etapas dos estudos biológicos que estuda os efeitos que as baixas temperaturas exercem sobre os tecidos, células e organismos vivos (Silva e Guerra, 2011). Assim, com o avanço dos estudos nesta área, desenvolveu-se técnicas de criopreservação, que consiste em uma tecnologia que preserva células, tecidos ou embriões a temperaturas abaixo do ponto de congelação da água, tendo como principal função manter a viabilidade das células por tempo indeterminado e preservar sua composição (Pegg, 2002).

Desta forma, a criopreservação espermática, além de possibilitar sua utilização por período prolongado e suspender o metabolismo espermático mantendo o potencial fecundante dos espermatozoides, tem sido amplamente utilizada para aumentar o potencial reprodutivo de touros de alto valor genético, sendo ferramenta imprescindível em programas de inseminação artificial, transferência e produção *in vitro* de embriões. Onde o uso do sêmen congelado permite rápido avanço genético dos rebanhos comerciais, permitindo a escolha de reprodutores que melhor atendam às necessidades de produção (Amann; Pickett, 1987; Castelo et al., 2008; Leite et al., 2011).

Apesar de ser um procedimento rotineiro nas centrais de congelamento de sêmen e na indústria da inseminação artificial, a criopreservação ainda é uma técnica que promove grande quantidade de estresse celular, induzindo modificações na membrana plasmática dos espermatozoides, os quais causam uma redução da motilidade e viabilidade espermática, impondo condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade, associada a uma elevada perda de células espermáticas que não resistem ao processo, resultando em uma diminuição do potencial de fertilidade das células (Purdy, 2006; Bucak et al., 2010).

No processo de criopreservação as células espermáticas passam por etapas de resfriamento, congelação e descongelação que são capazes de promover vários tipos de danos celulares que comprometem a fertilidade quando comparado com sêmen a fresco. Além desses fatores, outros também afetam a viabilidade do sêmen congelado como os constituintes do diluidor e a interação com os crioprotetores, as taxas de congelamento, descongelamento e formas de armazenamento (Watson, 2000; Lui Z., 1998; Leite et al., 2011).

O primeiro momento de estresse do espermatozoide se dá durante a fase de transição da membrana plasmática do estado normal em temperatura ambiente para o estado cristalino ou gel quando é exposta a temperatura de refrigeração a 5 °C. Quando o resfriamento é realizado de uma forma muito rápida, entre 30 °C e 0 °C, algumas células são induzidas a um estresse letal chamado de choque frio, sendo mais crítico quando são expostas na faixa de temperatura de 2 a 12 °C (Watson, 1995; Gonzalez, 2004).

O choque frio ou choque térmico é observado quando os espermatozoides se encontram com movimentos circulares, alterações ou diminuição da motilidade espermática, decréscimo da produção de energia, redução da taxa de glicose e respiração celular, tendo perdas de moléculas e íons para o meio extracelular devido o

aumento da permeabilidade da membrana. Todas essas alterações são originadas devido aos danos ocorridos na membrana espermática que, bioquimicamente, são diferentes. Pois, podem apresentar particularidades que influenciam na fluidez da membrana como a quantidade de colesterol e o grau de saturação dos ácidos graxos presentes na membrana, mas os constituintes estruturais são iguais para todas as espécies. Porém, o choque frio pode variar de acordo com o grau de maturação dos espermatozoides, variação de cada indivíduo, ejaculado, espécie e quantidade de plasma seminal (Amann e Pickett, 1987; Cottorello, 2002; Gonzalez, 2004; Celeghini, 2005).

Outro ponto crítico da criopreservação é a formação dos cristais de gelo que vai ocorrer de acordo com a velocidade de refrigeração, onde a água se move através da membrana plasmática do meio intracelular que é isotônico para o meio extracelular que se encontra mais concentrado. Assim, se a água não sair da célula e for se unir com a fase congelada do meio extracelular ela irá congelar formando os cristais de gelo no meio intracelular (Soares e Guerra, 2009). Quando o resfriamento é realizado de forma rápida os cristais são formados na parte interna e as células na maioria dos casos se tornam osmoticamente inativadas ou lesadas devido à desorganização da membrana (Denvireddy et al., 2002).

Já quando o resfriamento é realizado de forma muito lenta ocorre o congelamento da água no meio extracelular com um rápido aumento da concentração de solutos que promove uma perda rápida da água do meio intracelular para o meio extracelular levando a célula a se desidratar e a ocorrer à desnaturação das macromoléculas que levam a perda da sua integridade da membrana (Mazur, 1985; Holt, 2000). Desta forma, é necessário o uso de curvas adequadas de congelamento de sêmen para cada espécie onde deve ser lento o suficiente para não provocar a formação de cristais de gelo no meio intracelular e ao mesmo tempo rápida para evitar a exposição das células às altas concentrações de solutos por um tempo muito prolongado (Squires, 1999; Chaveiro et al., 2006).

Por outro lado, o descongelamento vai ser realizado de acordo com a taxa de congelamento que foi realizada. Pois, os espermatozoides necessitam de curvas adequadas para serem descongeladas a fim de não causar danos letais às células. Neste caso, se a congelamento foi realizada de forma rápida e a descongelamento de forma lenta pode ocorrer uma lesão mecânica da membrana, pois o gelo intracelular pode ser recristalizado em cristais menores. Já se a congelamento foi lenta e a descongelamento rápida

á água do meio extracelular vai entrar de uma forma muito rápida no meio intracelular causando um rompimento da membrana celular (Squires et al., 1999; Leite et al., 2011).

2.2 Ação dos diluidores sobre a criopreservação

Para que o sêmen possa ser conservado, ele deve ser devidamente diluído, podendo ter sua durabilidade estendida e ser transportado. Assim, a composição do diluidor é de extrema importância para os espermatozoides sobreviverem ao processo de criopreservação, pois o mesmo tem a função de proteger a membrana plasmática do espermatozoide contra o choque térmico e as injúrias mecânicas causadas pela manipulação, além de possuir a função de fornecer nutrientes e estabilizar o pH do meio (Verstegen et al., 2005; Chaveiro et al., 2006).

Portanto, para o espermatozoide manter sua capacidade de fecundar o gameta feminino após o processo de congelação e descongelação é necessário que as suas características sejam preservadas, como: manter o metabolismo para produção de energia, a motilidade progressiva, a preservação das enzimas localizadas na região do acrossoma e as proteínas da membrana plasmática, que são importantes na estruturação da membrana. Assim, o diluidor deve possuir algumas características essenciais como ser atóxico, apresentar substâncias iônicas e não iônicas para manter a osmolaridade, baixo custo, uma fonte lipoproteica de alto peso molecular para proteger contra o choque térmico como os crioprotetores e outros aditivos como antioxidantes, hormônios e antibióticos (Amann; Pickett, 1987; Vishwanath e Shannon, 2000; Aisen 2008).

Os crioprotetores são substâncias que tem a função de fornecer energia às células espermáticas, evitar a formação de cristais de gelo causados pela redução da temperatura, reduzir o estresse osmótico através da reposição da água necessária para reorganizar o volume celular com auxílio de interações com íons e macromoléculas mantendo e, assim, um ambiente favorável à sobrevivência da célula espermática (Medeiros, 2002; Purdy, 2006).

Desta forma, algumas substâncias foram estudadas nos diluidores com o intuito de diminuir os danos causados durante a criopreservação. Apesar do mecanismo de ação não está totalmente elucidado, acredita-se que estes agentes sejam responsáveis por reduzir o ponto de congelamento da solução, na qual é determinado com a diminuição da temperatura (Soares e Guerra, 2009). Além disso, alguns crioprotetores podem possuir fatores tóxicos aos espermatozoides, onde em elevadas quantidades pode interferir na capacidade fecundante do gameta, se tornando impróprio para os

espermatozoides. Entretanto, próprio para outros tipos de células (Graham, 1996; Watson, 2000).

Os crioprotetores podem ser divididos em duas categorias, sendo eles: penetrantes ou não penetrantes. Essa classificação vai ocorrer de acordo com o local de atuação deles, podendo ser na região intra ou extracelular (Sztejn, 2001; Celeghini, 2005).

Crioprotetores penetrantes são moléculas pequenas que conseguem atravessar a membrana plasmática dos espermatozoides atuando tanto no meio intra como extracelular, desidratando a célula espermática devido o efluxo de água intracelular para equilibrar o meio extracelular (Silva e Guerra, 2009). Assim, eles permanecem tanto na membrana quanto no citoplasma promovendo a desidratação celular por meio do seu efeito osmótico, onde penetram na membrana através da difusão passiva (Purdy, 2006). Dentre os crioprotetores penetrantes há o glicerol, o dimetil sulfóxido, o etileno glicol, o propileno glicol, assim como as suas associações (Silva e Guerra, 2009).

Na década de 50 o uso do glicerol começou a se destacar frente aos demais crioprotetores penetrantes, onde começou a ser usado na criopreservação de células e microrganismos. Devido a seu efeito osmótico, o glicerol atua diretamente na membrana plasmática, havendo evidências de que se liga a fosfolipídeos conseguindo reduzir a fluidez da membrana através de interações com as ligações proteicas e glicoproteínas da membrana (Parks e Graham, 1992). Assim, ele pode ser utilizado na criopreservação de sêmen bovino tanto no momento da diluição inicial, quando já está em uma fração única com o diluidor, sendo adicionado à temperatura ambiente, quanto adicionado de forma fracionada após a refrigeração, na temperatura de 5 °C (Kumar et al., 2003).

Já os crioprotetores não penetrantes, são moléculas grandes que não tem a capacidade de atravessar a membrana plasmática atuando no meio extracelular, sendo eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelação, sem que para isso necessitem penetrar no seu interior. Essas substâncias possuem proteínas, lipídeos e macromoléculas que podem ser encontradas no leite, na gema de ovo, açúcares, amidas e polímeros sintéticos (Graham, 1995; Borges et al., 2011).

Dentre os crioprotetores não penetrantes, a gema de ovo se destaca por ser o agente com boas respostas para proteção do espermatozoide contra o choque frio, mantendo a fertilidade dessas células após o congelamento e descongelamento, além de suas funções espermáticas (Bergeron et al., 2004). Entretanto, apesar do seu uso

contínuo nos diluidores, o mecanismo de ação na proteção dos espermatozoides não está totalmente elucidado (Holt, 2000).

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL), presentes na gema de ovo, tem ação na superfície da membrana plasmática dos espermatozoides através de interações com os fosfolipídios, promovendo alterações na membrana para que ela não tenha rupturas durante o processo de criopreservação (Moussa et al., 2002; Farstard, 1996). Apesar da importância desse crioprotetor, a gema de ovo consiste de um material biológico capaz de veicular microrganismos, dependendo da sua origem (Farstad, 2009). Assim, estudos com outros crioprotetores vem sendo usados para substituir a gema de ovo, como lecitinas de soja (Hiwasa et al, 2009), adição de trealose, glicina (Valente et al., 2010) e leite (Bergeron et al., 2007). Embora os resultados muitas vezes sejam inferiores aos encontrados com o uso da gema de ovo no meio diluidor (Silva e Guerra, 2011).

2.3 Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e estresse oxidativo

Os primeiros relatos sobre estresse oxidativo se deram em 1943, por Jon MacLeod, onde ao incubar os espermatozoides de seres humanos em condições de alta tensão de oxigênio, foi observado que a motilidade espermática foi diminuindo, podendo ser revertido com a adição da catalase. Assim, estes resultados levaram a conclusões que os espermatozoides de mamíferos têm a capacidade de gerar peróxido de hidrogênio, podendo prejudicar a motilidade dos espermatozoides (Aitken et al., 2012). Alguns anos depois, em 1946, as primeiras informações em espermatozoides bovinos foram publicadas onde foram confirmados os efeitos que a catalase e a peroxidase exercem sobre a manutenção da motilidade. Levando os autores a concluir que o peróxido de hidrogênio possui efeitos citotóxicos capaz de alterar o metabolismo e motilidade dos espermatozoides (Tosic e Walton, 1950).

O oxigênio é uma molécula de grande importância para a sobrevivência e metabolismo de diversas células, porém pode possuir efeitos tóxicos de acordo com o tipo de reação que sofre. Assim, as reações produzidas naturalmente no organismo através do próprio metabolismo como os subprodutos oriundo da respiração e a síntese de estruturas mais complexas, podem gerar as espécies reativas de oxigênio (ROS) onde temos os radicais livres mais encontrados como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH \cdot), e o metabólito peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Iwasaki; Gagnon, 1992; Chan et al., 1999; Borges et al., 2011).

Os radicais O_2^- são formados da adição de um elétron nas moléculas de oxigênio. Por ser um radical produzido principalmente na membrana mitocondrial, tem como seu campo de ação o local onde foi produzido, agindo pouco sobre as membranas lipídicas. Durante o processo de respiração celular ocorre a produção desse radical, além das reações com flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (Nordberg e Arnér, 2001).

Já o radical OH^- é formado a partir das reações de Fenton, onde o peróxido de hidrogênio é catalisado por íons ferro ou cobre (Fe^{++} ou Cu^+) dando origem ao radical hidroxila que é um dos radicais mais reativos em sistemas biológicos provocando a peroxidação lipídica nas membranas. O H^2O^2 é considerado um metabólito do oxigênio, gerado a partir da ação do superóxido dismutase sobre o O_2^- , sendo extremamente deletério por ter a facilidade de atravessar as membranas biológicas (Ferreira e Masubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001).

As ROS exercem tanto funções fisiológicas como patológicas nas células espermáticas. Essa atuação está associada tanto ao momento em que ela foi produzida, quanto à concentração, ao tempo que essas células foram expostas, associados a fatores extracelulares, como: temperatura e ambiente (Besalsky, 2002). Desta forma, as ROS, quando em concentrações reduzidas, são importantes para o controle e sinalização do crescimento celular, ao ataque de patógenos invasores, síntese enzimática de processos bioativos e detoxificação de substâncias estranhas (Soares e Guerra, 2009; Borges et al., 2011).

Nos machos, desde as primeiras fases do desenvolvimento das células germinativas quando já são capazes de produzir pequenas quantidades de ROS, elas estão envolvidas na condensação da cromatina dos espermatozoides, adaptando o núcleo das células germinativas por indução da apoptose ou pela proliferação das espermatogônias (Fisher e Aitken, 1997; Aitken, 1999). Nos espermatozoides maduros, as ROS vão atuar diretamente na fertilidade, sendo responsáveis pelos processos de capacitação espermática, hiperativação, reação acrossômica, estabilidade da bainha mitocondrial, motilidade espermática bem como a ligação espermática à zona pelúcida (Soares e Guerra, 2009; Borges et al., 2011; Jedrzejowska et al., 2012).

Quanto aos mecanismos bioquímicos de produção das ROS ainda não estão totalmente elucidados. Porém, relatos de Aitken (1995), informam que em espermatozoides humanos uma das principais fontes de produção do O_2^- é através da nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato NADPH, estando envolvida no ciclo da

NADPH-oxidase, demonstrando que os espermatozoides humanos possuem uma variedade de sistemas de transporte de elétrons, estando localizados na superfície celular podendo ser removidos facilmente pela atividade das enzimas NADPH (Aitken, 2003). Entretanto, De Lamirande e Lamothe (2009), avaliando as células espermáticas humanas através da técnica de *imuno blotting*, não encontraram relação entre a NADPH oxidase e a produção de O_2^- .

Sabeur e Ball (2006), ao tentar identificar qual reação é responsável pela produção dos ânions de superóxido em espermatozoides equinos, encontraram que a geração do O_2^- aumentou significativamente quando tinha a presença da NADPH-oxidase do que com sua ausência.

Outra hipótese referente à produção de ROS está relacionada à diaforese espermática presente na peça intermediária associada à cadeia respiratória dos espermatozoides. Como os espermatozoides precisam de um fornecimento constante de energia para manter sua motilidade, a região da peça intermediária é rica em mitocôndrias onde as NADH oxido-redutase dependentes agem. A produção de ROS é, significativamente, aumentada em mitocôndrias disfuncionais, que por sua vez afetam a função mitocondrial em espermatozoides (Evenson et al., 1982). Assim, pode existir uma relação mutuamente interligada onde ROS causa danos na membrana mitocondrial e a danificada causa aumento da produção de ROS (Agarwal e Prabakaran, 2005).

Plante et al. (1994), observaram que pouca parte das ROS produzidas durante o processo de respiração realizado nas mitocôndrias através da NADPH-oxido redutase dependente é liberado para fora das células ou seja para região extracelular ao contrário do que é produzido pela NADPH-oxidase que é produzida para região extracelular.

No ejaculado, diversas alterações presentes, podem influenciar na produção de ROS. Dentre as alterações temos espermatozoides com morfologias alteradas, principalmente quando apresentam citoplasma residual, indicando que possui imaturidade e reduzido potencial de fertilidade, tendo assim a capacidade de produzir maiores quantidades de ROS do que espermatozoides com estrutura normal (Gomez et al., 1996; Aziz et al., 2004). Além disso, há também diferença entre as quantidades de ROS produzidos de acordo com o estágio de espermatozoides produzidos (Henkel e Schill, 1998).

Nichi et al. (2007), ao realizarem experimento com espermatozoide de bovinos coletados direto do epidídimo e submetidos a dois métodos de conservação, constataram que os espermatozoides com gota citoplasmática proximal apresentaram maior

produção de ROS e foram mais susceptíveis ao estresse oxidativo do que os com gotas citoplasmáticas distais. Segundo Misro et al. (2004), seres humanos que apresentam muitos espermatozoides anormais produzem concentrações moderadamente elevadas de H_2O_2 , causando imobilização dos espermatozoides, principalmente pela depleção de ATP intracelular com diminuição da fosforilação das proteínas do axonema, além de induzir a peroxidação lipídica e resultar em morte celular.

Outra fonte de ROS, são os espermatozoides mortos ou imóveis e os leucócitos sendo estes as principais fontes de ROS, segundo Garrido et al. (2004). Os leucócitos em condições fisiológicas produzem até 1000 vezes mais ROS do que os espermatozoides. Esta produção elevada está relacionada a um importante papel no mecanismo de defesa das células contra infecções e inflamações. Onde leucócitos ativados tem a capacidade de infiltrar no órgão afetado secretando grandes quantidades de ROS que levam a eliminação de agentes infecciosos.

No entanto, este desequilíbrio de oxidantes e antioxidantes pode danificar as células. O número de leucócitos presentes no sêmen pode influenciar na quantidade de ROS presente, podendo causar problemas aos espermatozoides. Em seres humanos a grande quantidade de infiltração leucocitária pode estar relacionada ao estresse oxidativo no trato reprodutivo masculino (Aitken et al., 2012).

Baumber et al. (2002), ao adicionarem neutrófilos ativados ao sêmen de equinos, observaram que quanto maior a quantidade de neutrófilos presentes, maior a quantidade de ROS produzido e menor a motilidade espermática. Assim, determinaram que a quantidade de 5×10^6 neutrófilos ativados/mL é o suficiente para ter uma produção excessiva de H_2O_2 e reduzir a motilidade dos espermatozoides equinos *in vitro*.

Já quando a quantidade de ROS produzida é superior às necessidades das células ocorre a geração do estresse oxidativo (Aitken, 1995), que é causado pelo desequilíbrio entre a produção dos chamados ROS e a ação protetora do sistema antioxidante, responsável por sua neutralização e remoção. Um excesso de ROS provoca uma resposta patológica que conduz à lesão de células e tecidos. Os espermatozoides são particularmente suscetíveis aos efeitos nocivos do ROS, porque os seus componentes da membrana celular contém grande quantidade de ácido graxos poli-insaturados (Walczak-Jedrzejowska et al., 2013).

Esses ácidos podem ser oxidados através de reações de peroxidação lipídica onde o citoplasma das células possui pequenas concentrações de enzimas que neutralizam as ROS. Assim, a oxidação dos lipídeos é um processo que conduz a perda

da integridade da membrana, um aumento da sua permeabilidade, inativação das enzimas celulares, danos no DNA estrutural e apoptose celular (Henkel e Schill, 1998; Sanocka-Maciejewska, 2005; Shuppe et al., 2008).

A lipoperoxidação é dividida em etapas onde se inicia quando qualquer ROS é capaz de retirar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂-). E termina quando os radicais lipídicos e peroxila propagam-se até destruírem a si próprios (Hallwell e Gutteridge, 1999). Assim, por ser um processo fisiopatológico importante, resultando em uma série de ações degradativas, afetam a organização e a função de componentes celulares (Zabludovsky et al., 1999). Uma forma eficaz de avaliar o efeito da peroxidação lipídica no espermatozoide é através do método espectrofotométrico com ação do ácido tiobarbitúrico (TBA). Dessa forma, é possível medir a concentração dos produtos oriundos da peroxidação dos lipídios que nesse caso é o malonaldeído (MDA) ou substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Lapenna et al., 2001; Sanocka e Kurpisz, 2004). Tavalani et al. (2005), trabalhando com espermatozoides e plasma seminal de seres humanos astenozoospermicos e normozoospermicos, determinaram o nível de peroxidação lipídica através do MDA. Onde em pacientes astenozoospermicos apresentaram uma alta concentração de MDA, quando comparado com os que apresentavam características normais.

Em bovinos, foi observada uma associação entre os TBARS e a motilidade espermática. Onde os espermatozoides que sofreram maior reação de peroxidação lipídica apresentaram menor motilidade, maior concentração de TBARS e menor capacidade de ocorrer à reação acrossomal quando induzida. Assim, é demonstrado que espermatozoides com as membranas íntegras associadas com menor peroxidação lipídica tem maior facilidade de ocorrer a reação acrossomal devido a preservação da sua regularidade funcional (Beorlegui et al., 1997; Maia e Bicudo, 2009).

Apesar dos espermatozoides bovinos não sofrerem a peroxidação lipídica com facilidade quando comprado com o ser humano ou garanhão, o sêmen congelado e descongelado se torna mais susceptível à peroxidação lipídica do que o sêmen *in natura* (Trincheri et al., 1990). Maia (2006), ao avaliar o sêmen de ovinos criopreservados com antioxidantes e sem antioxidantes, encontrou após a criopreservação uma grande quantidade de radicais livres (O₂⁻; H₂O₂ e OH⁻), demonstrando que o processo induz a produção de ROS. Em equinos, Neid et al. (2002), ao avaliarem a membrana celular dos espermatozoides frescos, refrigerados e congelados, observaram um aumento da

peroxidação lipídica após o processo de criopreservação, quando comparado com o refrigerado.

No processo de criopreservação as alterações de temperatura, além da exposição das células ao oxigênio presente, associado à manipulação, podem induzir um aumento na produção de ROS com uma diminuição das defesas realizadas pelos antioxidantes. Assim, quanto maior for à manipulação dos espermatozoides maior serão os danos oxidativos que podem ocorrer (Maia, 2003; Soares e Guerra, 2009).

No sêmen refrigerado a 5 °C um dos principais fatores que induz uma diminuição da motilidade e da viabilidade espermática é o estresse oxidativo que ocorre mesmo com uma diminuição do metabolismo celular, pois a produção de ROS continua e promove uma queda da viabilidade do sêmen refrigerado (Çoian et al., 2010; Krzyzosiak et al., 2001).

2.4 Antioxidantes

Como a criopreservação espermática causa um aumento da produção de ROS, assim como o processo de capacitação espermático aumenta a permeabilidade da membrana acelerando a geração de ROS, os antioxidantes vêm sendo estudados ao longo tempo com o objetivo de melhorar os índices de fertilidade visando à manutenção da integridade dos espermatozoides submetidos ao processo de refrigeração e congelação através da redução das injúrias causadas pelo estresse oxidativo (Silva e Guerra, 2011).

Durante as fases finais de diferenciação dos espermatozoides, a maior parte do citoplasma residual é perdido junto com uma grande quantidade de antioxidantes endógenos que neutralizam o efeito prejudicial das ROS (Bansal e Bilaspuri, 2011). Desta forma, a principal fonte de antioxidantes está localizada no plasma seminal, pois existem evidências que sem o plasma seminal os espermatozoides estão mais sujeitos ao estresse oxidativo (Aitken e Curry, 2011).

A prévia diluição do sêmen para os processos de criopreservação promove uma diminuição da concentração dos antioxidantes presentes no plasma seminal ocasionando um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Desta forma, estudos recentes demonstram que a suplementação dos diluidores com antioxidantes tem mostrado bons resultados na manutenção da motilidade espermática e na integridade da membrana após a descongelação em bovinos, caprinos, ovinos, cães e na qualidade dos espermatozoides humanos (Bucak et al., 2010). Porém, a suplementação dos

espermatozoides com antioxidante no momento da fertilização *in vitro* prejudicou a qualidade dos espermatozoides bovinos, a formação de pronúcleos normais e o desenvolvimento para o estágio de blastocisto (Gonçalves et al., 2010).

Estudos demonstram que os antioxidantes são responsáveis por proteger os espermatozoides contra as ROS produzidas por espermatozoides anormais e normais ou por leucócitos presentes no sêmen. Tendo assim, a função de prevenir a fragmentação do DNA, melhorar a qualidade do sêmen em seres humanos fumantes, reduzir os efeitos da criopreservação, evitar que ocorra a peroxidação lipídica e reduzir as alterações na composição das membranas.

Com esse intuito, o sistema antioxidante pode ser classificado em enzimáticos, como: a glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSH-Rd), catalase e superóxido desmutase (SOD). E os não enzimáticos, como: glutathione reduzida (GSH), ácido ascórbico, vitamina E e A, carotenoides, coenzima Q-10, zinco, selênio e cobre (Agarwal et al., 2004; Wolski JK., 2011). Assim, a célula espermática possui duas linhas de defesa contra as ROS, sendo uma como detoxificadora do agente causador da oxirredução evitando a lesão celular onde temos GSH, SOD, catalase, GSH-Px, e vitamina E. Já a outra forma de defesa consiste em reparar as lesões ocorridas onde temos o antioxidante ácido ascórbico (vitamina C), GSH-Rd, GSH-Px e vitamina E, sendo pertencente à estrutura da membrana celular (Ferreira e Matsubara, 1997).

Assim, quanto aos antioxidantes enzimáticos, segundo Walczak-Jedrzejowska et al. (2013), o principal sistema de enzimas antioxidantes é chamado de tríade, onde tem o SOD, catalase e GSH-Px.

A SOD é uma enzima que elimina os ânions superóxido, dismutando em oxigênio e H_2O_2 , tanto no meio intracelular quanto extracelular (Nishikimi e Machlin, 1975). Na forma intracelular pode estar de duas formas, sendo na forma de SOD de cobre-zinco localizada, principalmente, no citoplasma contendo cobre e zinco no centro ativo ou o SOD de manganês, que está localizado principalmente na matriz mitocondrial com manganês no seu centro ativo. Na forma extracelular atua com os polissacarídeos de superfície, podendo estar na forma livre. Para a SOD agir contra H_2O_2 , deve ser conjugada com a catalase ou GSH-Px (Walczak-Jedrzejowska et al. 2013). Além disso, ela impede a hiperativação prematura e capacitação induzida por radicais superóxido antes da ejaculação (Lamirande e Gagnon, 1995).

A catalase corresponde a uma enzima oxirredutora que decompõe o H_2O_2 em duas moléculas de água e uma de oxigênio. O H_2O_2 é altamente tóxico para a célula,

uma vez que é o principal precursor da formação de radicais OH^\cdot (Ortega et al., 2003; Barreiros et al., 2006). Além disso, está relacionado com a capacitação espermática induzida por óxido nítrico, que consiste em um mecanismo complexo usando peróxido de hidrogênio (Lamirande e Gagnon, 1997).

Outro antioxidante enzimático é o sistema GSH-Px e GSH-Rd, sendo a peroxidase responsável por atuar sobre o H_2O_2 dando origem a duas moléculas de água e uma de glutatona oxidada. Já a GSH-Rd converte a glutatona oxidada junto com uma molécula de hidrogênio na presença da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada (NADPH) em duas moléculas de GSH e NADP (Christophersen, 1968; Silva e Guerra, 2011).

Os antioxidantes não enzimáticos como os carotenoides, ácido ascórbico, cisteína, vitamina E, taurina, trealose, hipotaurina e glutatona também exercem importantes funções como os carotenóides que são compostos orgânicos solúveis em gordura, sendo precursores da vitamina A. Estes são responsáveis por manter a integridade das membranas celulares, além de regular a proliferação celular como durante a espermatogênese (Hogarth e Griswold, 2010).

A vitamina C ou ácido ascórbico é uma substância solúvel em água, com importante capacidade antioxidante, onde no plasma seminal de seres humanos possui concentração 10 vezes maior do que no plasma sanguíneo (Lewis et al., 1997).

A vitamina E (α -tocoferol) é um composto químico orgânico solúvel em gordura localizado principalmente na membrana celular onde sua atividade antioxidante está relacionada à captura de radicais de SO e hidroxilas livres. Assim, ela previne a célula espermática contra danos, diminuindo a produção de ROS (Walczak-Jedrzejowska et al. 2013). Dentro do leque de agentes antioxidantes não enzimáticos, ainda há a cisteína, que é um ácido de baixo peso molecular precursor da glutatona onde adentra a membrana celular facilmente, melhorando a biossíntese de GSH intracelular tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Além disso, protege os lipídios da membrana e proteínas devido às suas propriedades de eliminação dos radicais indiretos (Uysay e Bucak, 2007). Com relação à trealose e a taurina, segundo Reddy et al. (2010), quando adicionaram essas substâncias sulfuradas aos espermatozoides de bubalinos, observaram que ocorreu uma proteção contras as ROS, após a criopreservação.

Ressalva-se que os efeitos dos antioxidantes quando usados nos diluidores podem variar de acordo com a quantidade colocada, além da quantidade de ROS presente que precisa ser inativado. Assim, os antioxidantes como a vitamina E podem

apresentar o efeito antioxidante ou se em quantidades superiores podem estimular a oxidação (Valença e Guerra, 2007).

2.5 Glutathione

A glutathione é um antioxidante, tiol não proteico, hidrossolúvel, que contém enxofre e por consequência é o mais abundante no meio intracelular das células de mamíferos. Uma das suas funções está relacionada à capacidade de reconstrução de grupos tiol (-SH) em proteínas, que podem ser eliminados durante o estresse oxidativo. Além disso, também possui a função de proteger as membranas celulares a partir da oxidação de lipídios impedindo a formação de oxigênio livre, participa na transdução de sinais, na expressão gênica e na apoptose. Assim, um déficit desse antioxidante leva à instabilidade da peça intermediária dos espermatozoides, o que resulta em um distúrbio na motilidade (Lenzi et al., 1994; Tew, 2001; Silva e Guerra, 2011).

Funciona como um cofator para a glutathione peroxidase na redução de substâncias tóxicas como H_2O_2 e outros hidroperóxidos. A cisteína é o precursor da glutathione intracelular, onde a síntese de GSH em condições *in vitro* pode ser prejudicada por causa da deficiência de cisteínas nos meios de comunicação, devido à sua elevada instabilidade e auto-oxirredução (Bucak et al., 2008).

Em condições normais, mais de 95 % da GSH presente nas células está na forma reduzida. Nas células, sua concentração pode variar de 1 a 8mM, sendo que a quantidade no sistema reprodutivo masculino pode variar de acordo com a espécie onde nos espermatozoides bovinos está numa concentração de 556pmol/mg e no plasma seminal 17pmol/mg (Bilodeau et al., 2000; Silva e Guerra, 2011). Apesar de geralmente a maior concentração de GSH se encontrar nos espermatozoides e não no plasma seminal, em suínos a concentração no plasma seminal é superior ao encontrado nos espermatozoides, segundo Strzezek et al. (2002). Desta forma, a quantidade de GSH presente no plasma seminal está diretamente ligado à fertilidade dos animais, pois concentrações baixas podem estar ligadas a quadros de subfertilidade ou de animais inférteis (Raijmakers et al., 2003).

Em suínos Gadea et al. (2004), analisando a concentração de GSH no plasma seminal no ejaculado e depois que ele foi submetido a criopreservação, observaram que ocorreu uma redução de 32% de GSH após a criopreservação. Já no sêmen de bovinos foi observado uma redução de 78% da concentração de GSH, após a criopreservação (Bilodeau et al., 2000).

Stradaoli et al. (2007), ao avaliarem a concentração de GSH nos diluidores à base de gema de ovo e sem produtos de origem animal, observaram uma diminuição da concentração de GSH para o diluente à base de gema de ovo. Assim, o diluidor sem produtos de origem animal manteve os níveis do peptídeo após a diluição, resfriamento e criopreservação do sêmen ($p < 0,05$). Foi encontrada uma concentração de $450 \mu\text{M}$ de GSH comparado com $40 \mu\text{M}$ de GSH no diluidor a base de gema de ovo.

Desta forma, a sugestão foi que a adição exógena de GSH para a realização da criopreservação poderia compensar a diminuição durante o congelamento (Silva e Guerra, 2011). Gadea et al. (2005), ao adicionarem 1mM e 5mM, observaram uma tendência, dependente da dose, para melhorar a função dos espermatozoides e aumentar a sua capacidade de fecundar. Porém, eles citam que a adição exógena de GSH só tem efeitos benéficos quando os níveis de GSH endógenos estão abaixo dos níveis normais do sêmen.

Soares et al. (2011), visando avaliar o efeito da GSH no sêmen de caprinos criopreservados com diluidor a base de leite desnatado, acrescentaram 2mM, 5mM e 7mM/ml de GSH no diluidor. Após a criopreservação foi avaliado a integridade das membranas e o potencial da membrana mitocondrial onde foi observado que as diferentes concentrações de GSH adicionadas ao diluidor não conseguiu preservar a integridade dos espermatozoides. Assim como, Silva et al. (2012), ao trabalharem com a concentração de 5mM de GSH no diluidor a base de leite desnatado submetido a diferentes períodos de estabilização, observaram que à adição não interferiu na qualidade dos espermatozoides de caprinos submetidos ao processo de criopreservação com diferentes tempos de estabilização. Já Soares et al. (2009), ao trabalharem com sêmen de caprino, observaram que a melhor resposta se deu quando adicionaram a concentração de 2mM de GSH.

No entanto, Câmara et al. (2009), trabalhando com sêmen de carneiros, submetendo-o à criopreservação com diluidor acrescentado de 0,5; 1,0 e 2,0mM, não encontraram diferença nas análises da cinética espermática, quando comparado com o grupo controle. Onde foi justificado que os seus efeitos não foram encontrados devido à ação do diluidor que era à base de gema de ovo, pois o mesmo tem uma variação quanto aos seus componentes e ao seu papel como antioxidante.

Em bovinos foi observado que os tios GSH/GSH-Px e GSH-Rd nas concentrações acima de 0,5mM foram capazes de manter a motilidade dos espermatozoides diluídos e criopreservados no diluidor TRIS. Após o descongelamento

foram incubados durante 6 horas a 38,5 °C em CO₂ na ausência de uma fonte externa de estresse oxidativo, conseguindo manter a motilidade (Bilodeau et al., 2001).

Tunce et al. (2010), ao realizarem avaliações no sêmen de bovinos criopreservados com diluidores acrescidos de GSH (0,5 e 2,0mM) e cisteína (5 e 10mM), observaram que a morfologia pós descongelamento, motilidade progressiva bem como as outras características da motilidade espermática não tiveram diferença significativa em comparação com o grupo controle. Ao avaliar a taxa de gestação de 233 vacas inseminadas com as amostras congeladas com os antioxidantes foi observado que não ocorreu diferença entre a taxa de gestação dos diferentes grupos (GSH com 0,5 e 2,0mM/ Cisteína com 5 e 10mM).

Já Sariozkan et al. (2009), ao avaliarem o efeito da GSH com a concentração de 2mM no sêmen de bovinos da raça Holandês, criopreservados com diluidor Bioxcell, observaram melhora nas características seminais quando compararam com o grupo controle. Porém, na taxa de gestação dos animais inseminados com GSH não obtiveram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com controle.

Song et al. (2012), trabalhando com sêmen de búfalos criopreservado com 0,75mM de GSH, realizaram FIV, obtendo boa qualidade de desenvolvimento embrionário, além de melhorar a qualidade espermática. Assim, sugeriram que o uso desse antioxidante nessa concentração pode ter elevado potencial de aplicação comercial para bubalinos. Já Ansari et al. (2011), observaram que quando o sêmen de búfalos foi submetido a refrigeração à 5 °C na concentração de 0,5 e 1,0mM de GSH, foi possível manter a motilidade, viabilidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides.

Em equinos foi demonstrado que a concentração de 2,5mM de GSH adicionado ao diluidor para realização da criopreservação melhorou as características espermáticas quando comparado com as concentrações de 5,0; 7,5 e 10mM (Oliveira et al., 2011).

2.6 Fator de crescimento semelhante a insulina do tipo – 1 (IGF-1)

Os fatores de crescimento consistem em peptídeos caracterizados por possuir alto peso molecular lançado na circulação sanguínea de mamíferos através do fígado ou pela produção local realizada por vários tecidos. Devido o seu alto peso é necessário que uma proteína carreadora, chamada de *Insulin-like Growth Factor Binding Protein* (IGFBP1-6), transporte os IGFs para diversas regiões do corpo, sendo assim,

responsáveis por regular a biodisponibilidade ligando aos receptores (Flores et al., 1998; Bartke, 2000).

O IGF-1 é um importante regulador das funções reprodutivas como na diferenciação celular da espermatogênese, motilidade espermática e indicativo de fertilidade tanto em machos como em fêmeas (Severaju et al., 2010).

Os efeitos do IGF-1 sobre a função reprodutiva nas fêmeas tem sido estudadas extensivamente, podendo está associado com a nutrição e a sua relação com a idade ao primeiro parto, taxa de concepção ao primeiro serviço e ao desenvolvimento embrionário pré-implantação (Velasquez et al., 2008). Porém, os possíveis efeitos que o hormônio possui na reprodução dos machos ainda é limitado (Henricks et al., 1998; Selvaraju et al., 2009). Desta forma, os fatores desempenham um papel importante no controle parácrino, autócrino e endócrino de diversos tecidos.

Nos testículos, o IGF-1 é produzido a partir das células de Sertoli e Leydig, sob o controle de FSH e LH, respectivamente (Spiteri-Grech et al., 1992; Lin, 1995; Lejeune et al., 1996). Podendo estimular a esteroidogênese por aumentar a densidade de receptores para gonodotrofinas e a expressão de enzimas importantes para esse metabolismo (Spiteri-Grech e Nieschlag, 1993). Além disso, ele autorregula a produção de testosterona e possui funções semelhantes à da insulina onde é responsável pela captação de glicose e ativação da síntese proteica (Ruckebusch; Phaneuf; Dunlop, 1991; Wang e Hardy, 2004).

Em suínos e outros animais existem estudos que demonstra que o efeito do IGF-1 está relacionado à multiplicação e diferenciação das células responsáveis pela produção de testosterona. Assim, está diretamente associado às células de Leydig, a produção de testosterona, aumentando o número de receptores de LH e hCG nas células (Le Roy et al., 1999; Gelber et al., 1992).

Esta substância atua como um ativador do metabolismo espermático onde está envolvido no movimento celular (motilidade e intensidade de movimento), aumentando o metabolismo de hidratos de carbono e, conseqüentemente, a capacidade de fecundação dos espermatozoides (Selvaraju et al., 2009). Contudo, o metabolismo da energia celular está relacionado com a geração de maior quantidade de radicais livres, o que poderia afetar a qualidade do sêmen e a capacidade fecundante dos espermatozoides (O'Flaherty et al., 1997).

Alguns estudos têm demonstrado que o IGF-I está presente no plasma seminal, enquanto que os receptores correspondentes foram detectados em espermatozoides de

suínos (Hirai et al., 2001) e coelhos (Minelli et al., 2011). Também tem sido demonstrado que, imediatamente após a adição desse hormônio no sêmen, a qualidade do esperma é melhorada em equinos (MacPherson et al., 2002), búfalo (Selvaraju et al., 2009) e suínos (Silva et al., 2011).

Brito et al. (2007) avaliaram o efeito da nutrição de touros associando as concentrações de IGF-1 ao desenvolvimento sexual e relataram que com a diminuição da concentração do IGF-1 ocorreu uma queda na concentração de testosterona. Também demonstraram que existem fortes associações positivas entre a concentração de IGF-1 e o tamanho dos testículos, sugerindo que o fator de crescimento pode ter efeitos mitogênicos diretos sobre esse órgão. Portanto, este hormônio pode regular não só a esteroidogênese testicular, mas também a proliferação celular em determinada fase de vida do animal.

Henricks et al. (1998), observando a presença de IGF-1 no plasma seminal de bovinos e sua relação com a motilidade dos espermatozoides, relataram que a concentração de IGF-1 no plasma seminal de bovinos pode variar entre touros e ejaculados, mas a concentração média encontrada foi de 116,29 ng/mL. Além disso, demonstraram que ao adicionar 100ng/mL de IGF-1 e avaliar a porcentagem de espermatozoides móveis e a velocidade em linha reta, foram superiores quando comparados com o controle. Levando a concluir que o IGF estimula a motilidade espermática podendo está envolvido no processo de fecundação na espécie bovina.

O mesmo foi encontrado em bubalinos, onde ao avaliarem a adição de 100ng/mL de IGF-1 ao sêmen criopreservado, observaram que a adição do fator de crescimento proporcionou um aumento da velocidade retilínea e da motilidade dos espermatozoides, além de ter aumentado o número de espermatozoides com integridade de membrana após 30 e 60 minutos de incubação e promovido uma diminuição da peroxidação lipídica nos grupos com 90 e 120 minutos de incubação a 37 °C quando comparados com o grupo controle (Selvaraju et al., 2009).

Já em ovinos, Padilha et al. (2012), ao avaliarem diferentes concentrações de IGF-1, observaram que os tratamentos com 100 e 250ng/mL de IGF-1 foram superiores ao controle com relação a motilidade e viabilidade espermática após uma hora do descongelamento. Porém, não teve diferença na integridade acrossomal e da membrana plasmática, além da taxa de gestação.

Uma vez que o receptor de IGF possui atividade tirosina quinase e seu ligante está presente no plasma seminal, o sistema IGF-I pode estar envolvido no sinal de

transudação, conduzindo ao aumento da motilidade, a capacitação espermática e exocitose acrossômica (Gupta, 2005).

A associação da concentração plasmática de IGF-I no sêmen com a motilidade e a morfologia dos espermatozoides, sugere que o IGF-I possa desempenhar um papel crucial na função espermática (Macpherson et al., 2002).

3. HIPÓTESE

A adição de Glutathione e IGF-1 no meio diluidor para congelação de sêmen bovino propicia maior qualidade, metabólica e estrutural, das células espermáticas após o descongelamento, aumentando a taxa de concepção.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a taxa de concepção, as condições metabólica e estrutural das células espermáticas bovinas após a congelação, utilizando meios diluidores acrescidos de IGF-1 e Glutathione.

4.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar a membrana plasmática e acrossomal após a criopreservação;
- 2- Avaliar a condição metabólica da célula espermática;
- 3- Verificar se concentrações elevadas de Glutathione no meio diluidor é lesivo as células espermáticas;
- 4- Determinar se o acréscimo de Glutathione e/ou IGF-1 no meio extensor de congelação aumenta a taxa de células espermáticas não capacitadas após o descongelamento;
- 5- Avaliar o efeito do antioxidante Glutathione reduzida, por meio dos testes funcionais e computadorizados;
- 6- Verificar se concentrações elevadas de IGF-1 no meio diluidor favorece a motilidade da célula espermática após a criopreservação;
- 7- Determinar se o acréscimo de Glutathione e/ou IGF-1 no meio de congelação aumenta a taxa de gestação.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Acre, sob número de registro: 23107.009836/2015-71.

5.1 Local

A primeira etapa do estudo foi realizada em uma fazenda de gado de corte da raça Nelore no município de Grajaú, localizada a -03° 40' 00" de latitude e -45° 22' 48" de longitude, tendo clima tropical úmido. As análises laboratoriais, após execução da primeira etapa, foram realizadas nos laboratórios de Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão e da Universidade de São Paulo.

A taxa de concepção, determinada pelas inseminações artificiais utilizando as partidas de sêmen congeladas por tratamento, foi realizada na propriedade rural supracitada.

5.2 Animais

Foram utilizados seis touros Nelores, com peso e idade média de 500 kg e 30 meses, respectivamente. Classificados como aptos à reprodução, segundo CBRA (1998). Todos os animais alocados no experimento passaram por exame andrológico previamente, sendo o ejaculado subdividido entre os tratamentos, bloqueando o efeito individual de cada unidade experimental sobre os tratamentos. sendo que todos os animais passaram por uma repetição totalizando, assim ,12 ejaculados.

Para a avaliação da fertilidade do sêmen foram utilizadas 240 novilhas, sendo que os animais foram distribuídos igualmente entre os tratamentos, bloqueando a categoria utilizada. Os animais passaram por avaliação ginecológica, por meio de ultrassonografia, antes de serem alocados no experimento. Após 45 dias da inseminação todos os animais passaram por nova avaliação ultrassonográfica para diagnóstico de prenhez.

5.3 Delineamento experimental

Foi utilizado o meio diluidor TRIS, a base de gema de ovo, sendo dividido em quatro tratamentos: TI - controle, TII - meio acrescido com Glutathione (2mM/mL), TIII - IGF-1 (100ng/mL), TIV - Glutathione (1mM/ml) + IGF-1 (50ng/ml).

Para cada tratamento foram congeladas 30 palhetas de sêmen por ejaculado, sendo utilizadas 10 palhetas para a inseminação e 20 para as avaliações morfológicas e funcionais.

5.4 Coleta e análise do sêmen pré-criopreservação

As coletas de sêmen dos touros foram realizadas por eletroejaculação, sendo realizada higienização do prepúcio antes de cada coleta, externamente com água e internamente com solução fisiológica, para evitar possíveis contaminações.

Logo após a coleta, foram realizadas as análises físicas e morfológicas de rotina. Cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática. Todo material utilizado na coleta e avaliação do sêmen foi mantido aquecido a 37 °C, para evitar choque térmico e alterações das características do sêmen.

No momento da coleta o tubo coletor foi revestido por um recipiente de isopor envolvido com papel alumínio, para evitar o choque térmico. O volume foi avaliado pela leitura direta no tubo de coleta graduado. A concentração foi avaliada coletando-se uma amostra do sêmen e diluindo-se na proporção 1:100, em uma solução de formol-salina tamponada e a contagem foi realizada por meio da câmara de Neubauer utilizando-se microscopia óptica com aumento de 400 vezes.

A motilidade e vigor foram avaliados subjetivamente, por meio de duplo cego (avaliação independente de dois avaliadores sem comunicação prévia), logo após a coleta, em preparação de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas, a 37 °C), por meio de microscopia óptica, em aumento de 100x; a motilidade foi expressa em porcentagem de espermatozoides móveis; enquanto que o vigor, que se refere à velocidade progressiva das células em movimento, foi classificada em escores de 1 a 5, sendo o escore 1 o mais lento e o escore 5 correspondendo ao mais rápido movimento progressivo uniforme.

Para a avaliação da morfologia espermática uma alíquota do ejaculado foi diluída em formol-salina tamponada, previamente aquecido (37 °C), para fixação e avaliado posteriormente, em laboratório, por meio de preparações úmidas, sob microscopia de contraste de fase (Microscópio Nikon Eclipse 50i), com aumento de 1000x, contando-se 200 células.

5.5 Criopreservação do sêmen

Após a avaliação da motilidade e vigor das amostras de sêmen, o ejaculado de cada touro foi dividido em quatro alíquotas (tratamentos) de mesmo volume, em tubos cônicos de 15 mL, e foram diluídas, utilizando-se para cada uma delas um tipo de hormônio ou antioxidante, IGF-1 e/ou Glutathione. A diluição foi realizada em banho maria à temperatura de 36 °C, atingindo uma concentração de 100×10^6 sptzs/mL e os tubos foram identificados quanto ao hormônio utilizado. O diluidor TRIS (fração única; Anexo 01) foi previamente preparado no laboratório do setor de Reprodução animal da EV-UEMA, utilizando equipamento esterilizado e água destilada deionizada, depois foi mantido em freezer a -15 °C, até o momento da utilização.

Em seguida, os tubos contendo as seis alíquotas diluídas de sêmen foram colocadas em recipiente plástico com água a 34 °C até atingir a temperatura ambiente (25 °C), para, então, as alíquotas serem envasadas em palhetas de 0,25 mL (25×10^6 sptzs/palheta), previamente identificadas quanto aos tratamentos, sendo vedadas com álcool polivinílico.

Para o resfriamento e congelamento do sêmen foi utilizado sistema programável de criopreservação de sêmen portátil (modelo TK-3000[®]) composto por um aparelho programável, equipado com um porta-palhetas de aço-inox, um tubo de resfriamento e uma caixa térmica para nitrogênio líquido.

Para o resfriamento as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, o qual foi adicionado ao tubo de resfriamento, permanecendo até alcançar 5 °C. O aparelho foi programado para realizar o resfriamento a partir da temperatura ambiente e seguindo uma curva de resfriamento (P2S2) de 0,5 °C/min até 5 °C, com duração em torno de 120 min. Ao final de cada tempo de equilíbrio, o porta-palhetas foi removido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido (nível de 7 cm), na qual foi realizada a curva de congelamento (P2S2) com uma taxa de -20 °C/min de 5 °C até -120 °C.

Após atingir esta temperatura (-120 °C) as palhetas foram removidas do porta-palhetas e imersas no nitrogênio líquido. Por fim, as palhetas foram colocadas em racks identificadas pelo nome do touro e tratamento e então armazenadas em botijões criogênicos contendo nitrogênio líquido (-196 °C), até o momento de realização das análises pós-descongelamento. Assim, sendo estabelecidos quatro tratamentos.

Neste experimento foi criopreservado apenas dois ejaculados por touro, e apenas os ejaculados que apresentaram motilidade igual ou superior a 70% de motilidade total e vigor mínimo de 3 (escala de 1-5), bloqueando o efeito do touro.

5.6 Análise do sêmen pós-criopreservação

Para cada análise realizada pós-descongelamento foram utilizadas duas palhetas de cada tratamento, buscando-se assim, retirar o efeito de palheta. As palhetas foram descongeladas em banho maria a 37 °C por 30 segundos. Após o descongelamento o sêmen foi colocado em um microtubo de 1,5 mL (tipo Eppendorf), homogeneizado e avaliados quanto aos parâmetros de motilidade e vigor visual (avaliados por microscopia óptica). Além disso, foram submetidos ao teste de termoresistência rápido, reação acrossomal e eosina-nigrosina.

O TTR foi realizado por meio da manutenção de uma alíquota seminal mantida em banho maria a 45 °C por 30 minutos, sendo a motilidade espermática avaliada a cada 10 minutos, a partir do momento 0.

O teste de reação acrossomal foi feito por meio do corante Giemsa-Azul de tripan, onde as células com acrossoma corado foram contabilizadas como íntegras. Para tal, o giemsa comercial, na concentração de 0,8 % foi diluído em água destilada em 1:1, para ser utilizado diretamente sob esfregaço na lâmina, após incubação com o azul de tripan, deixando por um período de 6 horas. O azul de tripan utilizado foi na concentração de 0,2 %, e incubado em banho-maria por 15 minutos.

O corante vital, eosina-nigrosina, foi utilizado para a contagem das células vivas, coradas em branco, onde as coradas em vermelho foram tidas como mortas. O percentual obtido serviu como base para as avaliações subjetivas de motilidade, aceitando-se um erro de 10% entre as avaliações, subjetivas e pelo corante.

5.6.1 Análise da morfologia espermática

Para a análise de morfologia espermática, alíquotas do sêmen pós-descongelamento, de cada tratamento, foram retiradas para análise posterior, e adicionadas a 0,5 mL de solução formol-salina tamponada, previamente aquecida à 37 °C, e em seguida, refrigeradas até o momento da análise.

Foi utilizada a técnica de preparações úmidas, com contagem de 200 células, em aumento de 1.000x, sob microscopia de contraste diferencial interferencial (DIC). As porcentagens das diversas anormalidades morfológicas foram agrupadas e classificadas em defeitos maiores e defeitos menores.

5.6.2 Análises da integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial e estresse oxidativo

As avaliações foram realizadas na Universidade de São Paulo, campus Pirassununga. Para esta análise foram colocados em um microtubo 150 µL da amostra do sêmen diluído em meio TALP *sperm*, na concentração de 20×10^6 espermatozoides/mL, adicionados 3 µL de PI (0,5 mg/mL em DPBS), 6 µL de JC-1 (153 mM em DMSO) e 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS). As amostras foram incubada por 8 minutos a 37 °C. Após a incubação uma gota (7 µL) desta foi utilizada para o preparo da câmara úmida, entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37 °C) e a leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência marca Nikon, Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm), com aumento de 1.000 x. As células foram classificadas em oito categorias de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, conforme os descrito por Celeghini et al. (2008).

O estresse oxidativo foi avaliado através da sonda fluorescente CellROX™ Reagente Deep Red. A partir da diluição do sêmen no meio TALP *sperm*, foi aliquoteado 50 µL e acrescido 1 µL de H33342 e 2 µL de CellROX. A amostra foi incubada por 30 minutos a 37 °C. Após a incubação foi centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm e uma gota (4 µL) desta foi utilizada para o preparo da câmara úmida, entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37 °C), sendo que a leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência marca Nikon, Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm), com aumento de 1.000 x.

5.7 Avaliação da fertilidade do sêmen: inseminação e taxa de concepção

Após as análises laboratoriais da qualidade do sêmen, foi realizada a inseminação com as amostras congeladas de cada tratamento. Os animais alocados no experimento passaram por avaliação do trato reprodutivo por meio de ultrassonografia (Chison D600Vet) para serem distribuídos dentro de cada tratamento. Animais que apresentaram alguma anomalia foram descartados.

Foram utilizados 60 animais por tratamento, perfazendo um total de 240 novilhas inseminadas, em tempo fixo (IATF), segundo o protocolo exposto abaixo (Gráfico 01).

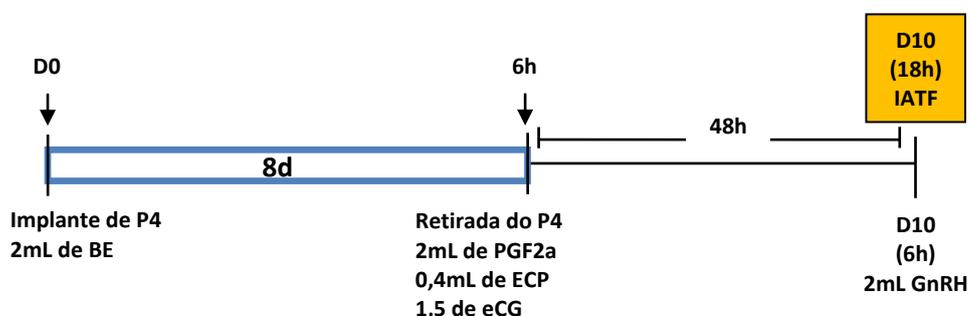


Gráfico 01: Protocolo para inseminação artificial em tempo fixo. P4: progesterona; BE: benzoato de estradiol; PGF2a: prostaglandina F2-alfa; ECP: cipionato de estradiol; eCG: gonadotropina coriônica equina; GnRH: hormônio liberador de gonadotropina.

O diagnóstico de gestação foi realizado 45 dias após a insmeinação com auxílio da avaliação ultrassonográfica (Mindray DP 2200 vet).

5.8 Análise Estatística

O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso, sendo cada touro um bloco. A variável TTRr enquadrou-se em blocos ao acaso com parcela subdividida. Utilizou-se o programa BioEstat 5.0 para comparação das médias encontradas. As variáveis paramétricas foram avaliadas pela ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de Tukey, e as variáveis não paramétricas pelo teste de Friedman, com significância de 5%. As respostas dicotômicas foram avaliadas por tabela de contingência, através do teste do Qui-quadrado. Todas as variáveis passaram pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Lilliefors.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análises preliminares

Com relação aos dados referentes ao exame imediato após a coleta do ejaculado dos animais alocados no experimento, observa-se na Tabela 01 os dados de: motilidade, turbilhonamento, vigor e concentração espermática.

Tabela 01. Análise subjetiva inicial do sêmen dos touros Nelore alocados no experimento.

	T01	T02	T 03	T 04	T 05	T 06	T 07	T08	T09	T10	T11	T12
Motilidade	90	80	80	80	90	80	80	80	70	90	80	70
Turbilhonamento	3	3	3	2	3	2	3	3	2	3	3	3
Vigor	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Concentração (x10 ⁹ spz/mL)	472	835	840	480	1280	740	1770	515	440	1135	500	600
Volume	8	8	9,5	8,5	8	9	7,5	9	9	7	8	12

Os touros alocados no experimento apresentaram boas características espermáticas de acordo com os critérios pré-estabelecidos. Conforme Pacheco et al. (2007), em estudo comparativo entre o perimetro escrotal, as características seminais e a idade, observaram que animais com a idade média de 30 meses apresentaram boas características espermáticas, semelhante aos aqui apresentados, estando esses valores dentro do padrão determinado pelo CBRA (1998), o que demonstrou variação entre a qualidade espermática dos diferentes touros, resposta esta, oriunda da individualidade.

6.2 Análises após a criopreservação

a. Motilidade e Vigor espermático

Após a criopreservação, quando avaliou-se a motilidade e o vigor de forma subjetiva, observou-se que não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 02).

Tabela 02: Motilidade e vigor após a criopreservação.

Características	<i>Controle</i>	<i>GSH</i>	<i>IGF-1</i>	<i>GSH+IGF-1</i>
Motilidade	37,9 ± 7,21	43,33 ± 8,61	42,08 ± 9,15	40 ± 9,77
Vigor	233 ± 0,49	2,58 ± 0,51	2,58 ± 0,51	2,5 ± 0,52

Não houve diferença entre os tratamentos (P>0,05) pelo teste de Friedman.

O tratamento com IGF-1 na concentração de 100ng/mL não apresentou diferença significativa (p>0,05) quando comparado com os demais tratamentos, diferente do que se esperava, uma vez que o IGF-1 é um fator de crescimento que está associado ao aumento na motilidade espermática. Pois, apesar dessa concentração está

de acordo com as condições fisiológicas onde Henricks et al. (1998), observando a concentração de IGF-1 no plasma seminal de bovinos, concluíram que ocorre uma grande variação na concentração desse fator de crescimento, podendo variar de acordo com o animal, alimentação e ejaculado, obtiveram uma média de 116,29ng/mL de IGF-1, citando que o hormônio está relacionado com o estímulo da motilidade espermática.

A resposta do presente estudo vai de encontro aos valores encontrados por Selvaraju et al. (2009), que ao avaliarem o efeito da adição de 100ng/ml de IGF-1 ao sêmen de bubalinos, observaram aumento da velocidade retilínea e da motilidade espermática. O mesmo foi encontrado por Padilha et al. (2012) que ao avaliarem o efeito do fator de crescimento ao sêmen de ovinos, observaram que a concentração de 100ng/mL, apresentaram valores de motilidade e viabilidade espermática superiores ao controle.

Esses dados demonstram que a quantidade de IGF-1 presente no diluidor usado na criopreservação não aumentou a motilidade espermática, podendo ser justificada pela sua ação ser semelhante à da insulina, onde possui a função de capturar os nutrientes presentes no diluidor, aminoácidos e açúcares, facilitando, assim, a passagem para a região interna das células. Com esse aumento de nutrientes no meio intracelular promovido pelo IGF-1, pode tornar o aproveitamento da energia de uma forma mais rápida, favorecendo a liberação de uma grande quantidade radicais livres, resultando na morte celular. Isso justifica o fato de não ter aumentado a motilidade espermática após a criopreservação e ter sido encontrado uma grande quantidade de células com elevado estresse oxidativo.

Apesar das afirmações de Henricks et al. (1998) informarem que em bovinos existe em média 1000 receptores para IGF-1 nas células espermáticas, outro ponto a ser considerado é que, se a quantidade dos receptores para esse hormônio, presentes na membrana da célula espermática dos bovinos alocados no experimento, foi numericamente pequeno, isso pode ter promovido nenhuma influência do IGF-1 na motilidade e/ou viabilidade espermática. Assim, segundo Vickers et al. (1999), se a concentração de receptores nos espermatozoides não for equivalente à quantidade de IGF-1 presente no plasma seminal ou diluidor, não vai ocorrer nenhuma melhoria na motilidade espermática.

Já quando se observa o efeito da GSH reduzida na motilidade e vigor espermático, a mesma não apresentou diferença frente aos demais tratamentos. Esses valores são semelhantes aos encontrados por Silva et al. (2012) que ao trabalharem com

a concentração de 5mM de GSH no diluidor para caprinos a base de leite, observaram que a adição não interferiu na motilidade dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação. Assim como os encontrados por Tunce et al. (2010), que ao realizarem avaliações no sêmen de bovinos com GSH nas concentrações de 0,5 e 2,0mM, observaram que não interferiram na morfologia pós criopreservação, bem como na motilidade espermática quando comparado com o grupo controle.

Porém, vão de encontro aos encontrados por Soares et al. (2009) que ao adicionar 2mM de GSH ao sêmen de caprinos observaram melhora na resposta da viabilidade espermática.

Sariozkan et al. (2009), também encontraram melhora na motilidade espermática quando adicionaram 2mM de GSH ao sêmen de bovinos da raça Holandês e compararam ao grupo que tinha BSA. Assim como aos encontrados por Oliveira et al. (2011), que ao adicionarem 2,5mM de GSH ao sêmen de equinos, observaram um aumento da motilidade quando comparado com as concentrações de 5mM, 7,5mM e 10mM. Essa variação de resultados pode está relacionada aos tipos de diluidores usados e a concentração do antioxidante.

b. Morfologia

Quanto às características morfológicas, os percentuais de defeitos maiores e menores após a criopreservação foram superiores em todos os tratamentos quando comparados aos encontrados na avaliação do sêmen fresco. Porém, quando comparados entre os tratamentos não foi observado diferença significativa (Tabela 03).

Tabela 03: Defeitos maiores e menores após a criopreservação.

Defeitos	<i>Controle</i>	<i>GSH</i>	<i>IGF-1</i>	<i>GSH+IGF-1</i>
Maiores	7,29 ± 1,81	6,15 ± 1,87	6,75 ± 1,98	6,83 ± 1,51
Menores	3,45 ± 1,68	2,95 ± 0,75	3 ± 0,97	2,87 ± 0,52

Não houve diferença entre os tratamentos (P>0,05) pelo teste de Friedman.

Os defeitos maiores e menores encontrados no sêmen a fresco foram de 5,5±1,16% e 3,25±1,28%, respectivamente. Quando comparados com os defeitos apresentados após a criopreservação, sendo os defeitos maiores de 7,29 ± 1,81 e menores de 3,45 ± 1,68. Observa-se que as patologias maiores encontradas no sêmen

após a criopreservação foram mais elevadas do que no sêmen a fresco, porém não obteve diferença significativa.

Apesar de ser um procedimento rotineiro nas centrais de congelamento de sêmen e na indústria da inseminação artificial, a criopreservação ainda é uma técnica que promove grande quantidade de estresse celular, induzindo modificações na morfologia dos espermatozoides, os quais causam uma redução da motilidade e viabilidade espermática, impondo condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade (Purdy, 2006; Bucak et al., 2010).

Nichi et al. (2007), demonstraram que espermatozoides bovinos com gota citoplasmática proximal apresentam uma maior produção de ROS, sendo mais susceptível ao estresse oxidativo do que os com gotas citoplasmáticas distais.

Quando se avalia o uso da GSH no diluidor e o fato de não ter diferença quando comparado com os demais tratamentos, observa-se que esse antioxidante possui a finalidade de diminuir as injúrias que as ROS podem provocar nos espermatozoides, sendo que uma das consequências do aumento no estresse oxidativo é a elevada quantidade de patologias espermáticas. Assim, a GSH manteve as morfologias sob controle.

Ansari et al. (2011), também observaram que o uso do antioxidante no sêmen de búfalos conseguiu manter a morfologia espermática sob controle, assim como a motilidade e viabilidade espermática.

Já o IGF-1 existem relatos que a adição desse hormônio no sêmen promove uma melhora na qualidade espermática de equinos (MacPherson et al., 2002), búfalos (Selvaraju et al., 2009) e suínos (Silva et al., 2011). Onde a morfologia espermática é preservada, sugerindo assim que o IGF-1 possui função crucial na função espermática dessas espécies.

c. Teste de termorresistência rápido

Após a descongelção, as células espermáticas criopreservadas em Tris-Gema, dentro de cada tratamento (T1: controle, T2: GSH, T3: IGF-1 e T4: associado), quando avaliadas entre si, não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) quando foram submetidas ao teste de termorresistência rápido (Tabela 04).

Tabela 04: Avaliação da motilidade no momento 0', 10', 20' e 30' do TTRr entre os tratamentos.

<i>Momento TTRr</i>	<i>Controle</i>	<i>GSH</i>	<i>IGF-1</i>	<i>GSH+IGF-1</i>
0'	40,8 ± 8,48	40,8 ± 10,64	41,25 ± 11,10	39,16 ± 7,92
10'	39,5 ± 7,21	42,0 ± 7,21	42,5 ± 10,11	40,41 ± 10,10
20'	30,4 ± 15,44	29,16 ± 12,76	35,0 ± 13,48	32,08 ± 13,72
30'	12,9 ± 16,84	18,33 ± 18,50	20,41 ± 15,29	18,33 ± 18,38

Não houve diferença entre os tratamentos ($P>0,05$) pelo teste de Friedman.

Esses dados se assemelham aos encontrados por Peixoto et al. (2008) que ao trabalhar com sêmen de cães, observaram que o diluidor com GSH e Trolox não interferiu na motilidade quando comparado com o controle durante o teste de TTR lento por 60 minutos.

No entanto, quando se avaliou a manutenção da viabilidade espermática dentro dos tratamentos, compararam-se os tempos iniciais e finais do TTR, observando-se que o grupo controle, IGF-1 e associação tiveram diferença significativa ($P<0,05$) dentro do tempo, tendo uma diminuição da motilidade. Esses valores condizem com os encontrados por Pursel et al. (1972) que observaram que no decorrer do tempo de incubação ocorre diminuição da porcentagem de espermatozoides móveis em bovinos.

Porém, ao avaliar a glutathiona, constatou-se que houve homogeneidade da motilidade dentro do período analisado, tendendo a preservar a motilidade por mais tempo, não tendo diferença entre o momento inicial e final ($P>0,05$) (Tabela 05).

Tabela 05: Avaliação da motilidade nos quatro momentos do TTRr dentro de cada tratamento.

<i>Momento TTRr</i>	<i>Controle</i>	<i>GSH</i>	<i>IGF-1</i>	<i>GSH+IGF-1</i>
0'	40,8 ± 8,48 ^a	40,8 ± 10,64	41,25 ± 11,10 ^a	39,16 ± 7,92 ^a
30'	12,9 ± 16,84 ^b	18,33 ± 18,50	20,41 ± 15,29 ^b	18,33 ± 18,38 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem ($P<0,05$) pelo teste de Friedman.

Esses dados se assemelham aos encontrados por Bilodeau et al. (2001), que ao avaliar o sêmen de bovinos criopreservados acrescidos com 0,5mM de GSH e incubados por seis horas a 38,5 °C, foi possível manter a motilidade dos espermatozoides quando não teve uma fonte externa de estresse oxidativo (H₂O₂) adicionada ao diluidor. Já Tunce et al. (2010), ao realizarem avaliações com sêmen de

bovinos criopreservados com diluidores acrescidos de GSH (0,5 e 2,0mM), observaram que a motilidade progressiva não teve diferença quando comparado com o grupo controle.

Um fato que pode está associado ao efeito da glutathiona no diluidor a base de gema de ovo é que apesar da gema de ovo possuir boas propriedades antioxidantes elas podem ser destruídas durante o processo de preparação, manipulação e armazenamento do extensor. Apesar da gema de ovo ser um constituinte que está na concentração de 20% do diluidor e por possuir lipoproteínas que tem propriedades antioxidantes. Elas possuem poucos antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos são oxidados e não regenerados (Wilson et al., 1992; Yamamoto et al., 1994). Devido a isso, a adição da glutathiona foi benéfica na manutenção da motilidade dentro do tempo estabelecido.

d. Avaliação das membranas

Quanto aos percentuais de membrana plasmática e acrossomal intactas demonstrados pela associação de sondas fluorescentes é possível verificar que não ocorreu diferença significativa entre os diferentes tratamentos (Tabela 06).

Tabela 06: Quantidade de espermatozoides com membrana acrossomal e plasmática intacta.

Características	<i>Controle</i>	<i>GSH</i>	<i>IGF-1</i>	<i>GSH+IGF-1</i>
PI	13,79± 7,77	14,95 ± 8,01	14,95 ± 11,53	11,37 ± 7,6
AI	40,87 ± 15,15	43,79 ± 16,26	44,70 ± 25,45	40,04 ± 13,37
PIAI	13,58 ± 7,47	14,66 ± 7,85	14,87 ± 11,38	14,29 ± 10,76

Não houve diferença entre os tratamentos (P>0,05) pelo teste de Tukey.

A integridade da membrana é essencial para comunicação entre células, onde a membrana intacta tem a função de regular o transporte de íons pela membrana através de diferentes receptores (Jeyendran et al., 1984; Van der Vem et al., 1986).

Nota-se que a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra em todos os tratamentos foi baixa, assim como a de acrossoma intacto. Quando se avalia os espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossoma é possível observar que uma pequena quantidade de espermatozoides estão aptos a realização da fecundação. Visto que, para a célula espermática ser capaz de realizar suas funções e chegar ao local da fecundação é necessário que as membranas espermáticas estejam íntegras.

Assim, ficou constatado que a GSH e o IGF-1 nas concentrações usadas não conseguiram melhorar a qualidade da membrana acrossomal e plasmática. Esses resultados podem indicar que a GSH por ser um antioxidante importante na manutenção das membranas celulares onde impede a formação de oxigênio livre e, assim, diminuindo os radicais livres no meio intracelular não possui efeito positivo, com relação a integridade das membranas, quando adicionado na concentração de 2mM.

Isso provavelmente se deu devido a uma diminuição da concentração desse antioxidante durante o processo de criopreservação. Segundo Bilodeau et al. (2000), após a criopreservação do sêmen bovino ocorre uma diminuição de 78% da concentração de GSH. Além disso, tem sido demonstrado que dependendo da concentração do GSH ele pode causar danos aos espermatozoides bovinos, por alterar a osmolaridade celular, fragilizar a membrana plasmática e causar ruptura nessa estrutura (Bilodeau et al., 2001).

O mesmo foi observado por Stradaioli et al. (2007), que observaram que nos diluidores para bovinos a base de gema de ovo ocorre uma diminuição na concentração de GSH quando comparado com os sem produtos de origem animal.

Esses dados são semelhantes aos encontrados por Soares et al. (2011), que ao avaliar as concentrações de 2mM, 5mM e 7mM/mL de GSH no diluidor, constataram que as diferentes concentrações não conseguiram preservar a integridade da membrana dos espermatozoides de caprinos. O mesmo foi encontrado por Silva et al. (2012), ao trabalhar com 5mM de GSH no diluidor a base de leite observaram que a adição não interferiu na qualidade dos espermatozoides caprinos submetidos ao processo de criopreservação.

Já Sariozkan et al. (2009), ao trabalharem com bovinos da raça Holandês adicionaram ao diluidor 2mM de GSH e após a criopreservação observaram uma manutenção na qualidade das membranas espermáticas quando comparado com o grupo controle. Porém, ao avaliarem a taxa de gestação na concentração usada de GSH não obteve diferença significativa comparado com grupo controle.

Quando se refere ao IGF-1, observou-se que não promoveu melhora na manutenção da integridade das membranas espermáticas. Esses dados são contrários aos encontrados por Brito et al (2007) que observaram uma correlação positiva entre a concentração de IGF-1 e a manutenção da integridade das membranas. Porém, Selvaraju et al. (2010) ao trabalharem com sêmen de búfalos e acrescentar 100ng/mL de IGF-1 ao diluidor e testar a integridade do acrossoma em diferentes períodos de incubação,

observaram o hormônio não promoveu efeito na integridade do acrossôma dos espermatozoides quando foram comparados com o grupo controle, onde esse parâmetro pode ser útil para predizer a capacidade fertilizante dos espermatozoides. Porém, citou que a funcionalidade da membrana plasmática foi mantida. Além disso, demonstraram a importância do papel antioxidante deste hormônio, pois ele promoveu uma redução da lipoperoxidação lipídica.

Padilha et al. (2012) ao avaliarem diferentes concentrações de IGF-1 no sêmen de ovinos, observaram que as concentrações de 100 e 250 ng/mL não influenciaram na integridade acrossomal e da membrana plasmática dos espermatozoides ovinos quando comparados com o grupo controle, assim como, na taxa de gestação das ovelhas.

e. Estresse oxidativo

Quando se analisou o estresse oxidativo com auxílio da sonda CellRox Deep Red, responsável por avaliar a quantidade de ROS, como hidróxido e peróxido de hidrogênio, presentes nas células espermáticas, com e sem estresse, observou-se que o IGF-1 apresentou diferença significativa ($P > 0,05$), pois apresentou uma maior quantidade de células com estresse oxidativo, quando comparado com os demais tratamentos (Tabela 07).

Tabela 07: Espermatozoides com e sem estresse oxidativo nos diferentes tratamentos.

CONDIÇÃO	Estresse Oxidativo	
	SEM	COM
CONTROLE	85.46 ± 9,97	14.54 ± 10,08 ^a
GLUTATIONA	82.79 ± 19,84	17.21 ± 19,21 ^a
IGF	63.63 ± 24,10	36.38 ± 24,10 ^b
ASSOCIAÇÃO	75.96 ± 20,26	24.04 ± 20,26

Letras distintas na mesma coluna diferem pelo teste Exato de Fisher ($P < 0,05$)

Esses dados enfatizam os comentados por Severaju et al. (2009), onde informaram que o IGF-1 é responsável por ser um ativador do metabolismo espermático onde está envolvido no aumento da motilidade espermática e, por consequência, no aumento do metabolismo de hidratos de carbono.

O'Flaherty et al. (1997) afirmaram que o aumento no metabolismo de energia das células espermáticas está relacionado com a geração de maior quantidade de radicais livres, podendo afetar a qualidade espermática e a sua capacidade fecundante. Pois, as reações produzidas naturalmente no organismo através do próprio metabolismo como os subprodutos oriundo da respiração e a síntese de estruturas mais complexas,

podem gerar as espécies reativas de oxigênio (ROS), onde se tem os radicais livres mais encontrados, como: o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot) e o metabólito peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Iwasaki; Gagnon, 1992; Chan et al., 1999; Borges et al., 2011)

Porém, Selveraju et al. (2009) afirmaram que quando o IGF-1 foi adicionado ao sêmen de búfalos e submetidos ao teste do MDA, observaram correlação direta com a redução dos níveis de peroxidação lipídica. Esses dados estão de acordo com as afirmativas de Alvarez e Storey, (1982), onde informaram que grupos com IGF-1 podem promover uma melhora na motilidade de espermatozoides após a criopreservação devido a redução na peroxidação lipídica.

O IGF-1, além de possuir funções relacionadas à motilidade também foi citado possuir funções na capacitação espermática, onde em seres humanos com diferentes quadros de infertilidade, o IGF-1 adicionado ao sêmen em programas de fertilização *in vitro* auxiliou na capacitação espermática (Sanchez – Luengo et al., 2005). Desta forma, uma vez que o receptor de IGF possui atividade tirosina quinase e seu ligante está presente no plasma seminal, o sistema IGF-I pode estar envolvido no sinal de transdução, conduzindo ao aumento da motilidade, a capacitação espermática e exocitose acrossômica (Gupta, 2005).

Assim, no momento em que se realizam os processos de capacitação espermática, hiperativação, reação acrossômica, alteração no metabolismo espermático e motilidade espermática ocorre uma produção de ROS que vão atuar também nesses processos (Soares e Guerra, 2009; Borges et al., 2011; Walczak-Jedrzejowska et al. 2013). Desta forma, como o IGF-1 é um hormônio que estimula a hiperativação, a motilidade espermática e está envolvido na reação acrossômica auxiliando no processo de ligação dos espermatozoides à zona pelúcida ele promove uma maior liberação de ROS nos espermatozoides causando o aparecimento do estresse oxidativo.

Como a sonda utilizada avalia a quantidade de hidróxido e peróxido de hidrogênio presente na amostra (Alves, 2015). Esses radicais são os principais subprodutos do aumento do metabolismo espermático induzido pelo fator de crescimento.

Já a GSH, observa-se que 82,79% das células espermáticas não apresentaram estresse oxidativo, isso demonstra que apesar de não ter tido diferença significativa quando comparada com o controle, a GSH conseguiu manter as ROS sob controle.

Gadea et al. (2005), ao trabalharem com GSH na concentração de 1mM e 5mM, observaram que a adição exógena desse antioxidante só tem efeito quando os níveis de GSH endógenos estão abaixo dos níveis normais.

Os dados encontrados por Soares et al. (2011) vão de encontro aos resultados obtidos, pois trabalhando com sêmen de caprinos criopreservados com diluidor a base de leite desnatado, demonstrou que a adição de 2mM de GSH provocou danos subletais aos espermatozoides devido a exposição espermática ao O_2^- , resultando em aumento da produção de ROS. Assim, concluíram que a adição de GSH, nas concentrações usadas, não foi adequada para inativar ROS como O_2^- e OH^- .

Ansari et al. (2011), trabalhando com sêmen de búfalos refrigerado a 5 °C, observaram que a adição de glutatona na concentração de 0,5 e 1,0mM foi possível manter os níveis de estresse, mantendo também a viabilidade espermática. Já Tunce et al. (2010), observaram no sêmen bovino que os diluidores acrescidos de GSH (0,5 e 2,0mM), não tiveram diferença significativa com relação ao estresse oxidativo quando comparado com o grupo controle.

f. Taxa de Gestação

Ao realizar o diagnóstico de gestação nas 240 novilhas com 45 dias da inseminação, observou-se que após a inseminação a taxa de gestação por tratamento não diferiram ($P>0,05$). Onde a média entre os tratamentos foi de 40% (Gráfico 02).

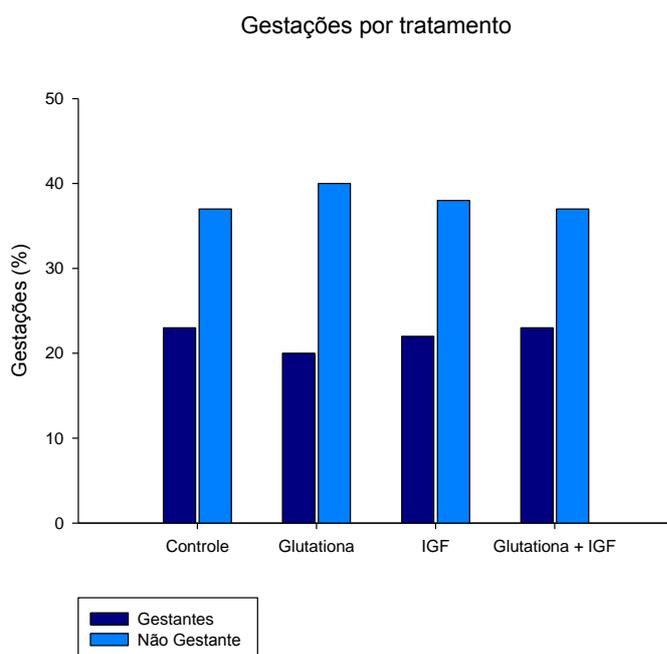


Gráfico 02: Diagnóstico de gestação nos diferentes tratamentos:

Esses dados são contrários aos obtidos por Sinha et al. (1996) quando trabalharam com sêmen de caprinos com a concentração 2 e 5mM de GSH, observando maior motilidade, integridade do acrossoma e taxas de concepção, quando comparados com o grupo controle. Assim como, Song et al. (2012), que ao trabalhar com sêmen de búfalos com 0,75mM de GSH na FIV, conseguiram uma boa qualidade de desenvolvimento embrionário quando comparado com os demais grupos. Além de melhorar a qualidade espermática.

Porém, os dados são semelhantes aos observados por Sariozkan et al. (2009) que ao avaliarem a concentração 2mM de GSH criopreservados com diluidor Bioxcell nos espermatozoides de bovinos, concluíram que apesar de ter mantido as características seminais, a taxa de gestação dos animais inseminados com GSH não obteve diferença significativa ($P < 0,05$), quando comparado com grupo controle.

Tunçe et al. (2010), ao realizarem avaliações no sêmen de bovinos criopreservados com diluidores acrescidos de GSH (0,5 e 2,0mM) e cisteína (5 e 10mM), observaram que a taxa de gestação de 233 vacas inseminadas com as amostras congeladas com os antioxidantes não apresentaram diferença entre os diferentes grupos (GSH com 0,5 e 2,0mM/ Cisteína com 5 e 10mM).

A adição de GSH ao diluidor submetido aos processos de congelamento e descongelamento de sêmen é esperado uma melhora na qualidade e na capacidade de fecundação dos espermatozoides como foi demonstrado por Gadea et al. (2004), uma vez que a adição de GSH ajuda a manter a motilidade espermática (Foote et al., 2002; Funahashi Sano, 2005) e a proteger contra danos oxidativos (Alvarez e Storey, 1989). Porém, no presente estudo apesar da GSH ter mantido a motilidade e ter preservado 82% das células espermáticas contra o estresse oxidativo, não foi possível obter diferença significativa entre as taxas de gestações, pois existem outros fatores que podem ter influenciado no momento da fecundação.

Com relação ao IGF-1, Henricks et al. (1998) afirmaram que o IGF-1 presente no plasma seminal bovino pode interagir com uma determinada região acrossomal do espermatozoide, onde possui receptores de IGF-1. Essa interação pode aumentar a motilidade espermática e o vigor. Assim, a presença do fator de crescimento no trato

reprodutivo masculino e feminino, bem como de seus receptores sugere um possível papel na regulação em eventos de pré-implantação.

Segundo Quetglas et al. (2001), a adição de IGF-1 na maturação *in vitro* ou cultura dos embriões não teve efeito benéfico no desenvolvimento de embriões bovinos. Esses dados estão de acordo com os encontrados por Padilha et al. (2012) que avaliaram diferentes concentrações de IGF-1 e observaram que os tratamentos com 100 e 250ng/mL de IGF-1 foram superiores ao controle com relação as características seminais após uma hora do descongelamento. Porém, não teve diferença na taxa de gestação dos animais quando comparado com o grupo controle.

Assim, mais estudos são necessários para entender o mecanismo pelo qual o IGF-1 sofre para prever seu efeito sobre a fertilidade.

7. CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos, conclui-se que:

- a. O IGF-1 e a associação não causaram mudanças na motilidade espermática, na integridade da membrana plasmática e acrossomal;
- b. O IGF-1 promoveu aumento do estresse oxidativo;
- c. A GSH não causou mudanças na integridade da membrana plasmática e acrossomal, mas favoreceu na manutenção da motilidade espermática durante o tempo de avaliação;
- d. O IGF-1, a GSH e associação não promoveram diferenças na taxa de gestação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Agarwal, A.; Nallella, K.P.; Allamaneni, S.S.; Said, T.M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reproduction Biomed Online**, v.8, p: 616, 2004.

Agrawal, A.; Prabakaram, S.A. Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a difficult balance. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**. Vol.3. No.1 p: 1-8, 2005.

Ahima, R.S.; Saper, C.B.; Flier, J.S. Leptin regulation of neuroendocrine systems. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.21, n.3, p. 263-307, 2000.

Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis. **Journal of Reproduction Fertility**.v.115, p. 1–7, 1999.

Aitken. R.J.; Jones, K.T. and Robertson, S.A. Reactive Oxygen Species and Review Sperm Function—In Sickness and In Health. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 6, 2012.

Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal Cell Science**, v.108, p.2017–2025, 1995.

Aitken R.J.; Ryan A.L.; Curry B.J.; Baker M.A. Multiple forms of redox activity in populations of human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.9, p.645-661, 2003.

Amann R.P.; Pickett B.W. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-174, 1987.

Ansari, M.S.; Rakha, B.A.; Iqbal, R.; Akhter, S.; Effect of Glutathione in Extender on the Freezability of Sahiwal Bull Spermatozoa **Pakistan Journal. Zoological.**, v. 46(1), p. 17-21, 2014.

Aziz N.; Saleh R.A.; Sharma R.K.; Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. **Fertility Steril**, v. 81, p. 349–354, 2004.

Beconi, M. T.; Francia, C. R.; Mora, N. G. Effects of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**. V. 40, p. 841-851, 1993.

Bergeron, A.; Crête, M.H.; Brindle, Y.; Manjunath, P. Lowdensity lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biologic Reproduction**, v.70, p.08-17, 2004.

Bergeron, A.; Brindle, Y.; Blondin, P.; Manjunath, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biologic Reproduction**, v.77, p.120-126, 2007.

Beorlegui, N.; Cetica, P.; Trinchero, G.; Córdoba, M.; Beconi, M. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. **Andrologia**, v.29, p.37-42, 1997.

Bucak, M.N.; Ates, S.; Ahin, A.; Yuce, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ramsemen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant**, v. 75, p. 128–134, 2008.

Bucak, M.N.; Sariozkan, S.; Tuncer, P.B.; Sakin, F.; Atessahin, A.; Kulaksiz, R.; Cevik, M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant**, v. 89, p. 24–30, 2010.

Bucak, M.N.; Tuncer, P.B.; Sariözkan, S.; Baspinar, N.; Taspinar, M.; Kenan, C.; Bilgili, A.; Akalin, P.P.; Buyukleblebici, S.; Aydos, S.; Ilgaz, S.; Sunguroglu, A.; Oztuna, D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v. 61, p. 248–253, 2010.

Câmara, D.R.; Silva, S.V.; Medeiros, L.R.D. Efeito da adição de antioxidantes ao meio diluidor na qualidade do sêmen ovino pós-descongelção. In: **SINCORTE** – Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 4, , João Pessoa – PB, 2009.

Castelo, T.S.; Frota, T.R.; Silva, A.R.. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinária Brasileira**, v.2, p.67-75, 2008.

CBRA 1998. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.

Celeghini, E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186f. **Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Reprodução Animal)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo

Chan, A.C.; Chow, C.K.; Chiu, D. Interaction of Antioxidants and Their Implication in Genetic Anemia. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 222, n.3, p.274-282, 1999.

Chaveiro, A.; Liu, J.; Engel, B. Significant variability among bulls in the sperm membrane permeability for water and glycerol: Possible implications for semen freezing protocols for individual males. **Cryobiology**, v. 53, n. 3, p. 349-359, 2006

Christophersen, B.O. The inhibitory effect of reduced glutathione on the lipid peroxidation of microsomal fraction and mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 106, p. 515-522, 1968.

Cottorello, A.C.P. Criopreservação de sêmen equino utilizando associação de etilenoglicol e glicerol. 2002. 47f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

De Lamirande E and Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal Andrologic**. v.13; p. 368–378, 1992.

De Lamirande, E.; Lamonthé, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. **Free Radic Biologic Medicine**, v.46, p.502-510, 2009.

Denvireddy, R.V.; Swalund, D.J.; Olin, T.; Vincent, W.; Troedson, M.H.T.; Bischof, J.C.; Roberts, K.P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the

presence and absence of cryoprotective agents determined used differential scanning calorimetry. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 222-231, 2002.

Evenson, D.P.; Darzynkiewicz, Z.; Melamed, M.R. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. **Journal Histochem Cytochem**, v. 30, p. 279-280, 1982.

Farstard, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251-260, 1996.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Assistência Médica Brasileira**, v.43, p.1-16, 1997.

Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Assistência Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

Fisher, H.M. and Aitken, R.J. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. **Journal of Experimental Zoology**, v.277, p. 390–400, 1997.

Gadea, J.; Sellés, E.; Marco, M.A.; Coy, P.; Matás, C.; Romar, R. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, v.62, p. 690 – 701, 2004.

Gadea, J.; Garcia-Vazquez, F.; Matas, C.; Gardon, J.C.; Canovas, S.; Gumbao, D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. **Journal of Andrology**, v. 26, p. 396-404, 2005.

Gelber SJ, Hardy MP, Mendis-Handagama SMLC, Casells SJ. Effects of insulin-like growth factor-I on androgen production by highly purified pubertal and adult rat Leydig cells. **Journal Andrologic**, v.13, p.125–30, 1992.

Gnessi, L.; Fabbri, A.; Spera, G. Gonadal Peptides as Mediators of Development and Functional Control of the Testis: An Integrated System with Hormones and Local Environment. **Endocrine Reviews**. v.18, n.4, p.541-609, 1997.

Gomez, E.; Buckingham, D.W.; Brindle, J.; Lanzafame, F.; Irvine, D.S. and Aitken, R.J. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. **Journal Andrologic**, v.17, p. 276–287, 1996.

Gonçalves, F.S.; Barreto, L.S.S.; Arruda, R.P.; Perri, S.H.V.; Mingoti, G.Z. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction Domestic Animal**, v.45, p.129–135, 2010.

Gonzalez, R. A. F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre os parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino. 93f. **Dissertação** (Mestrado), Pirassununga/SP, 2004.

Graham, J.K. Response of spermatozoa to freezing. In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. **Fort Collins**. Proceedings... Fort Collins: Colorado State University, p. 83-95, 1995.

Graham, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Reproduction and Technology**. v. 12, n. 1, p. 131-145, 1996.

Henkel R and Schill WB. Sperm separation in patients with urogenital infections. **Andrologia**, v. 30 Suppl 1: 91–97, 1998.

Henricks, D.M.; Kouba, A.J.; Lackey, B.R.; Boone, W.R.; Gray, S.L. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility, **Biologic. Reproduction**, v.59, p. 330–337, 1998.

Hirai, M.; Boersma, A.; Hoeflich, A. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors, **Journal. Andrologic**, v. 22, p. 104–110, 2001.

Hiwasa, M.; Kohno, H.; Togari, T.; Okabe, K.; Fukui, Y. Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v.55, p.50-54, 2009.

Hogarth, C.A. and Griswold, M.D. The key role of vitamin A in spermatogenesis. **Journal Clinical Invest**, v. 120; p. 956–962, 2010.

Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 1/3, p. 3-22, 2000.

IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil 2009**. Rio de Janeiro, v.56, 2009.

Iwasaki, A.; Gagnon, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 57, p. 2409-2416, 1992.

Jones, R, M. T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. **Journal Reproductions Fertility**, v. 50, p. 255-260, 1977.

Kraus, M.; Tichá, M.; Zelezná, B. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, v.65, n.1, p.33-46, 2005.

Kumar, S.; Millar, J.D.; Watson, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p.246-253, 2003.

Lapenna, D.; Ciofani, G.; Pierdomenico, S.D.; Giamberardino, M.A.; Cuccurullo, F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid preoxides in human plasma. **Free Radic Biologic Medicine**, v.31, p.331-335, 2001.

Lejeune, H.; Chuzel, F.; Thomas, T. Paracrine regulation of Leydig cells, **Annales Endocrinologie**, v. 57, p. 55–63, 1996.

Leite, P.A.; Schreder, G.G.; Almeida, C.L.R.; Zúccari, C.E.S.N.; Silva, E.V.C. Criopreservação do sêmen bovino. **UNOPAR Científica Ciências Biolpgicas e da Saúde**, v. 13, p.279-86, 2011.

Lenzi, A.; Picardo, M.; Gandini, L.; Lombardzo, F.; Terminali, O.; Passi, S.; Dondero, F. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. **Human Reproduction**, v. 9, p. 2044–2050, 1994.

Lewis SE, Sterling ES, Young IS and Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility Steril**, v. 67, p. 142–147, 1997.

Lin, T. Regulation of Leydig cell function by insulin-like growth factor-I and binding Proteins. **Journal. Andrologic**, v.16, p.193–196, 1995.

Macpherson, M.L.; Simmen, R.C.M.; Simmen, F.A.; Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. **Biologic Reproduction**, v. 67 p.648–654, 2002.

Maia, M.S.; Bicudo, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, 2009

Maia, M.S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase. 2006. 147f. **Tese (Doutorado)**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP.

Mazur, P. Basic concepts in freezing cell. In: Deep freezing of boar semen, 1985, Uppsala. **Proceedings**. Uppsala, p.199- 222, 1985.

Maxwell, W.M.C.; Watson, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen, **Anais Reproductions Science**. v. 42: 1-4, p. 55-65, 1996.

Medeiros, C.M.O.; Forell, F.; Oliveira, A.T.D.; Rodriguez, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. **Theriogenology**, v. 57, p.327-340, 2002.

Meseguer, M.; Garrido, N.; Simo'n, C.; Pellicer, A.; Remohí, J. Concentration of glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Journal Andrologic**, v. 25, p.773–780, 2004.

Misro, M.M.; Choudhury, L.; Upreti, K.; Gautam, D.; Chaki, S.P.; Mahajan, A.S.; Babbar, R. Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative stress in subjects presenting a normal semen profile. **Internacional Journal Andrologic**, v. 27, p.82-87, 2004

Moussa, M.; Martinet, V.; Trimeche, A.; Tainturier, D.; Anton, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by na easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

Neagu, V.R.; García, B.M.; Sandoval, C.S.; Rodríguez, A.M.; Ferrusola, C.O.; Fernández, L.G.; Tapia, J.A.; Peña, F.J. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. **Theriogenology**, 73, 645–650, 2010.

Neid, D.M.; Gadella, B.M.; Collenbrander, B. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 295-298, 2002

Nichi, M.; Goovaerts, I.G.F.; Barnabe,V.H.; De Clerco, J.B.P.; Bols, P.E.J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on *in vitro* fertilization capacity of sperm collected fro bovine epididymides stored at 4 and 34°C. **Theriogenology**, v.67, p.334-340, 2007.

Nishikimi, M.; Machlin, L.J. Oxidation of atocopherol model compound by superoxide anion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 170, p. 684-689, 1975.

Nordberg, J.; Arnér, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biologic Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.

O'Flaherty, C.; Beconi, M.; Beorlegui, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen–thawed bull spermatozoa, **Andrologia**, v. 29, p. 269–275, 1997

Oliveira, R.A. Antioxidantes na viabilidade do sêmen equino congelado e resfriado. **Tese de Doutorado** – Universidade Federal de Goiás, 2011.

Padilha, R.T.; Magalhães-Padilha, D.M.; Cavalcante, M.M.; Almeida, A.P.; Haag, K.T.; Gastal, M.O.; Nunes, J.F.; Rodrigues, A.P.R.; Figueiredo, J.R.; Oliveira, M.A.L. Effect

of insulin-like growth factor-I on some quality traits and fertility of cryopreserved ovine semen. **Theriogenology**, v. 78, p. 907–913, 2012.

Parks, J.E.; Graham, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.

Pegg, D.E. The History and Principles of Cryopreservation. Seminars. **Reproductive Medicine**, v.20, n.1, p.05-14, 2002

Plante M, de Lamirande E and Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. **Fertil Steril**. v.62, p. 387–393, 1994.

Purdy, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215-225, 2006.

Raijmakers, M.T.M.; Roelofs, H.M.J.; Steegers, E.A.P. Glutathione and glutathione s-transferases Al-1 and Pl-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 1, p. 169-172, 2003.

Reddy, N.S.S.; Mohanarao, G.J.; Atreja, S.K. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalua bubalis*) sperm quality following cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.119, p.183-190, 2010.

Sabeur, K.; Ball, B.A. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, p.701-706, 2006.

Sanocka–Maciejewska D, Ciupinska M and Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. **Journal Reproduction Immunologic**, v. 67, p. 51–56, 2005.

Sanocka, D.; Kurpisz, M. Reactive oxygen species and sperm cell. **Reproduction Biologic Endocrinol**, v. 2, p.12, 2004.

Sarlos, P.; Molnar, A.; Kokai, M.; Gabor, G.Y.; Rátky, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinary Hung**, v.50, p.235-245, 2002.

Selvaraju, S.; Nandi, S. Subramani, T.S.; Raghavendra, B.S.; Rao, S.B.N.; Ravindra, J.P. Improvement in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa functional parameters and

fertility in vitro: Effect of insulin-like growth factor-I. **Theriogenology** , v. 73, p.1–10, 2010.

Selvaraju, S.; Reddy, I.J.; Nandi, S.; Rao, S.B.N.; Ravindra, J.P. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro; **Animal Reproduction Science**, v.113, p. 60–70, 2009.

Silva, S.V., Guerra, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.35, n.4, p.370-384, 2011.

Silva, D.M.; Zangeronimo, M.G.; Murgas, L.D.S.; Rocha, L.G.P.; Chaves, B.R.; Pereira, B.A.; Cunha, E.C.P. Addition of IGF-I to storage-cooled boar semen and its effect on sperm quality. **Growth Hormone & IGF Research** , v.21, p. 325–330, 2011.

Soares, A.T.; Guerra, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência. Agropecuária.**, João Pessoa, v.3, n.2, p.53-63, jun. 2009.

Soares, A.T.; Silva, S.S.; Almeida, F.C.; Lemos, P.F.B.A.; Nunes, J.F.; Peixoto, C.A.; Guerra, M.M.P. Espermatozoides caprinos criopreservados em meio à base de leite desnatado acrescido de glutathiona reduzida. **Ciência Rural**, v.41, n.11, p.1991-1997, 2011.

Soares, A.T.; Silva, S.V.; Lemos, P.F.B.A. Atividade mitocondrial, integridade de membrana plasmática e motilidade de espermatozoides caprino submetidos à criopreservação em meio adicionado de glutathiona reduzida. In: **SINCORTE – Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte**, 4, 2009, João Pessoa – PB.

Song, X.M.; Lu, S.S.; Wang, M. Li, Q.Y.; Li, D.; Yang, X.G. Addition of Glutathione to Semen Extender During Sperm Sorting can Improve *in vitro* Embryonic Development and *in vivo* Fertility in Buffalo. **Journal of Animal and Veterinary Advance**, v. 11 (23), p. 4482-4488, 2012

Spiteri-Grech, J.; Nieschlag, E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis – a review. **Journal Reproduction and Fertility**, v.98, n.1, p.1-14, 1993.

Spiteri-Grech, J.; Nieschlag, E. The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function, *Hormone Research*, v. 38, p. 22–27, 1992.

Squires, E.L.; Pickett, B.W.; Graham, J.K.; Vanderwall, D.K.; Mccue, P.M.; Bruemmer, J. Cooled and frozen Stallion Semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, bulletin, N. 9, p. 80, 1999,

Strzezek, J. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. **Reproductive Biology**, v.2, n.3, 2002

Stradaoli, G.; Sylla, L.; Monaci, M.; Maiorino, M. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for semen quality analysis. **Theriogenology**, v.72, p.1– 8, 2009.

Sztejn, J.M.; Noble, K.; Farley, J.S. et al. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 42, n. 1, p. 28-39, 2001.

Tena-Sempere, M.; Barreiro, M.L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.188, n.1-2, p. 9-13, 2002.

Tosic, J.; Walton, A. Metabolism of spermatozoa. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its effects on motility and survival, **Biochem Journal**, v.47, p. 199–212, 1950.

Tuncer, P.B.; Bucak, M.N.; Buyukleblebici, S.; Sariozkan, S.; Yeni, D.; Eken, A.; Akalm, P.P.; Kinet, H.; Avdatek, F.; Fidan, F.; Gundogan, M. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. **Cryobiology**, v. 61, p. 303–307, 2010.

Uysal, O.; Bucak, M.N. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. **Acta Veterinaria Brno**, v.76, p.383-390, 2007.

Valença, R.M.B.; Guerra, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, p.47-53, 2007.

Valente, S.S.; Pereira, R.M.; Baptista, M.C.; Marques, C.C.; Vasques, M.I.; Silva Pereira, M.V.C.; Horta, A.E.M.; Barbas, J.P. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**, v.117, p. 74–77, 2010.

Velazquez, M.A.; Spicer, L.J.; Wathes, D.C. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction Domestic Animal **Endocrinology**, v. 35, p. 325–342, 2008.

Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

Vishwanath, R.; Shannon, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 23-53, 2000.

Zabludovsky, N.; Eltes, F.; Geva, E.; Brkovitz, E.; Amit, A.; Barak, Y.; Hareven, D. Bartoov, B. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameter and IVF outcome. **Andrology**, v.31, p.91-98, 1999.

Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.81-92, 2000.

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

Wolski, J.K. Rola mikroelementów i witamin w niepłodności męskiej [Role of trace elements and vitamins in male infertility]. *Przeegl Urol.* 2011; Suppl 4: 1–4.

Wang, G.; Hardy, M.P. Development of Leydig cells in the insulin-like growth factor-I (igf-I) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation. **Biologic Reproduction**, v.70, p.2–9, 2004.

ANEXOS

ANEXO 01 - Composição do diluidor TRIS/GEMA a 20%

Ingredientes	Quantidade
Tris (tris(hidroximetil)aminometano)	2,42 g
Ácido cítrico P.A.	1,36 g
Frutose P.A.	1,0 g
Gema de ovo	20 mL
Glicerol P.A. 99,5% (Glicerina)	7 mL (7% v/v)
Penicilina G potássica	0,028 g
Água destilada deionizada q.s.p.	*q.s.p. para 100 mL

(*) q.s.p. – quantidade suficiente para completar o volume de 100 mL. P.A. – Puro para Análise

Fonte: Leite, 2008