



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

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 - MA
2015



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

33

34

DIEGO SANTOS ALMEIDA

35

36

37

38

39

40

41

42

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

43

44

45

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação da Universidade Estadual do Maranhão,
como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Ciência Animal.

46

47

48

49

50

51

Área: Conservação e Reprodução Animal

52

Orientador: Prof. Dr. Fernando Andrade Souza

53

Co-Orientador: Prof. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

São Luís - MA

67

2015

FOLHA DE AVALIAÇÃO

68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111

Nome: Diego Santos Almeida

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Eneiva Carla Carvalho Celeghini
Universidade de São Paulo
(1º membro)

Prof. Dr. Ricardo de Macedo Chaves
Universidade Estadual do Maranhão
(2º membro)

Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos
Universidade Estadual do Maranhão
(3º membro)

Prof. Dr. Fernando Andrade Souza
Universidade Federal do Acre
(Orientador)

112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132

Almeida, Diego Santos, 1990-

Concepção de novilhas *Bos indicus* utilizando sêmen criopreservado com antioxidante e IGF- 1 / Diego Santos Almeida – São Luís, 2015.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2015.

Orientador: Fernando Andrade Souza

1. Bovinos (Nelore) – Reprodução – Dissertações. 2. Sêmen – Análise – Dissertações. 3. Glutathione – Dissertações. 4. IGF-I –

CDD

133
134
135

136
137
138
139

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 aprovado 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

140
141
142
143
144

AGRADECIMENTOS

145

146

147 Primeiramente a **Deus**, que me mostrou as ferramentas necessárias e deu-me
148 forças e motivação a cada dia para concluir mais esta etapa;

149 Aos meus pais, **Marcio de Oliveira Almeida** e **Conceição de Maria Santos**
150 **Almeida** e ao meu irmão **Diogo Santos Almeida** pelo amor sincero, esforço, dedicação
151 na criação, confiança em mim depositada, apoio durante a minha caminhada e
152 ensinamentos;

153 A minha avó, **Maria Terezinha** pelo incentivo, amor e apoio;

154 Aos meus **familiares** que acreditam no meu progresso e não medem esforços
155 para que eu o alcance;

156 A minha namorada **Ylana**, pelo apoio, carinho, amizade, convívio, paciência nos
157 dias de estresse e que muitas vezes me deu suporte e ajudou até altas horas da
158 madrugada.

159 Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fernando Andrade Souza**, pelo exemplo de ética
160 e profissionalismo, pela atenção, oportunidade, paciência, orientações concedidas,
161 amizade, a cima de tudo pela confiança depositada em mim e por acreditar que seria
162 possível a conclusão deste trabalho;

163 Aos meus amigos de trabalho, **Mysa Tatiana, Samara Cristine, Diego Moraes,**
164 **Brenda e Sergio** que contribuíram diretamente e indiretamente para realização de tal
165 trabalho e meu crescimento profissional além de ter tido bons momentos de
166 descontração e principalmente amizade.

167 A **Profa. Dra. Carla Celeghini**, que mesmo sem me conhecer aceitou ser co-
168 orientadora deste trabalho, além de está sempre disponível, auxiliando na realização de
169 boa parte das análises realizadas na Universidade de São Paulo.

170 Aos amigos de trabalho, **Maíra, Shirley e Prof. Dr. Rubens Paes**, pela acolhida
171 e ensinamentos transmitidos nas análises realizadas na Universidade de São Paulo.

172 Ao proprietário dos animais, Sr. Renato Pontes, que gentilmente abriu as portas
173 da Fazenda Soberana, onde desenvolvemos o projeto. Além do Médico Veterinário, Dr.
174 Wendel que junto com as pessoas responsáveis pelo manejo dos animais sob a
175 coordenação do senhor Josa, agradeço pelos momentos de auxílio e descontração.

176 Ao Mestrado em Ciência Animal pela oportunidade de conclusão desta Pós-
177 Graduação;

178 À FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do
179 Maranhão), pela concessão de bolsa que foi de grande ajuda no desenvolvimento deste
180 trabalho;

181 Aos membros desta banca, pela disponibilidade e colaboração para o trabalho;

182 A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização do mesmo;

183

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

186 **Autor:** Diego Santos Almeida

187 **Orientador:** Fernando Andrade Souza

188
189 **RESUMO**

190
191 Objetivou-se com esse estudo avaliar a taxa de concepção, as condições metabólicas e
192 estrutural das células espermáticas bovinas após a congelação, utilizando meios
193 diluidores acrescidos de IGF-1 e glutatona. Foram utilizados 6 touros da raça Nelore,
194 aptos a reprodução animal segundo o CBRA. Dois ejaculados de cada touro foram
195 coletados e submetidos a quatro tratamentos: TI – Controle; TII – Glutaciona
196 (2mM/mL); TIII - IGF-I (100ng/mL); e TIV – Glutaciona (1mM/mL) + IGF-I
197 (50ng/mL). Foi realizada análise subjetiva da motilidade e vigor espermático logo após
198 a coleta do sêmen e após o congelamento foram realizadas análises morfológicas e
199 funcionais como Teste de Termoresistência Rápida (TTRr), integridade de membrana
200 plasmática e acrossomal (PIAI) por meio de sondas fluorescentes, estresse oxidativo e a
201 taxa de concepção de novilhas da raça nelore. As variáveis paramétricas foram
202 avaliadas pela ANOVA, comparando-se através do teste de Tukey e as não paramétricas
203 pelo teste de Friedman, com significância de 5%. No TTRr os tratamentos não
204 apresentaram efeito dentro do tempo ($P > 0,05$) 0, 10, 20 e 30 min. Porém, quando
205 avaliado no tempo 0 e 30 min a glutaciona manteve a motilidade dentro do tempo
206 analisado ($P < 0,05$) de $40,8 \pm 10,65$ e $18,33 \pm 18,50$, respectivamente. A avaliação das
207 sondas fluorescentes e os efeitos dos tratamentos sobre as integridades da membrana
208 plasmática e/ou acrossomal, também não apresentaram efeitos dos tratamentos ($P >$
209 $0,05$), onde se obteve resultados de PIAI para os tratamentos TI, TII, TIII e TIV de
210 13,58%, 14,66%, 14,87% e 14,29%, respectivamente. Quando avaliado o estresse
211 oxidativo com a sonda CellROX, Deep Red, se observou que o IGF-1 apresentou maior
212 quantidade de células espermáticas com estresse ($P < 0,05$), TI ($14,54 \pm 10,08^a$), TII
213 ($17,21 \pm 19,21^a$), TIII ($36,38 \pm 24,10^b$) e TIV ($24,04 \pm 20,26^a$). A taxa de gestação não
214 apresentou diferença entre tratamentos ($P > 0,05$), tendo uma média de 36,58% por ciclo
215 estral. Conclui-se que o IGF-1 e associação não apresentaram alteração na motilidade e
216 integridade das membranas, porém aumentou o número de células com estresse
217 oxidativo. Já a glutaciona, apesar de não ter causado alteração na integridade das
218 membranas, permitiu a manutenção da motilidade dentro do tempo analisado.

219 **Palavras-chave:** Fator de crescimento, Glutaciona, Nelore.

220
221
222
223
224
225

226 ***Bos indicus* heifers design using cryopreserved semen with antioxidant and IGF -1**
227

228 **Autor:** Diego Santos Almeida

229 **Orientador:** Fernando Andrade Souza

230

231 **Abstact**

232 The objective of this study was to evaluate the conception rate, metabolic and structural
233 conditions of bovine sperm cells after freezing, using means with IGF-1 and
234 glutathione. Six bulls were used Nellore, of breeding animals according to the CBRA.
235 Two ejaculates from each bull were collected and submitted to four treatments: TI -
236 Control; TII -Glutathione (2 mM / mL); TIII - IGF-I (100ng / mL) and TIV -Glutathione
237 (1mM / mL) + IGF-I (50ng / mL). Was performed subjective motility analysis and
238 sperm vigor immediately after collection of the semen and after freezing were carried
239 out morphological and functional analysis as the heat resistance Test (TTRr), plasma
240 membrane integrity and acrosome (PIAI) by means of fluorescent probes, stress
241 oxidative and conception rate of Nellore breed heifers. The parametric variables were
242 evaluated by ANOVA, comparing by Tukey test and the nonparametric by Friedman
243 test, with significance level of 5%. In TTRr treatments had no effect in time (P> 0.05)
244 0, 10, 20 and 30 min. However, when assessed at time 0 and 30 min glutathione motility
245 kept within the examined time (P <0.05) 40.8 ± 10.65 and 18.33 ± 18.50 , respectively.
246 The evaluation of fluorescent probes and the effects of treatments on the integrity of the
247 plasma membrane and / or acrosome, showed no effects of the treatments (P> 0.05),
248 where we got results PIAI for treatments, TI, TII, TIII and TIV of 13.58%, 14.66%,
249 14.87% and 14.29%, respectively. When measured with oxidative stress CellROX Deep
250 Red probe, was observed that IGF-1 showed more of the sperm with stress (P <0.05), TI
251 ($14.54 \pm 10,08^a$), TII ($19,21 \pm 17 21^a$), TIII ($36.38 \pm 24,10^b$) and TIV ($24.04 \pm 20,26^a$).
252 The pregnancy rate was not different between treatments (P> 0.05), with an average of
253 36.58% per estrous cycle. We conclude that IGF-1 and association did not have changes
254 in motility and membrane integrity, but increased the number of cells with oxidative
255 stress. Already glutathione, although it has not caused changes in membrane integrity,
256 motility possible to maintain within the examined time.

257

258 **Palavras-chave:** Growth Factor, Glutathione, Nellore.

259

260

261

262

263

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros de motilidade, turbilhonamento, vigor, concentração e volume dos ejaculados de touros Nelore alocados no experimento analisados de forma subjetiva, São Luis, 2015.....	43
Tabela 2	Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) da motilidade e vigor em diferentes tratamentos do sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.....	43
Tabale 3	Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) dos defeitos maiores e menores em diferentes tratamentos do sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.....	46
Tabela 4	Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) da motilidade no momento 0', 10', 20' e 30' do TTRr em diferentes tratamentos do sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.....	47
Tabela 5	Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) da motilidade em dois momentos 0' e 30' do TTRr em diferentes tratamentos do sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.....	48
Tabela 6	Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) de espermatozoides com membrana acrossomal e plasmáticas intactas em diferentes tratamentos do sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.....	48
Tabela 7	Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) de espermatozoides com e sem estresse oxidativo em diferentes tratamentos do sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.....	51
Tabela 8	Porcentagem de novilhas Neloires gestantes e não gestantes após a inseminação com diferentes tratamentos do sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 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..... 42

- 266
- 267
- 268
- 269
- 270
- 271
- 272
- 273
- 274
- 275
- 276
- 277
- 278
- 279
- 280
- 281
- 282
- 283
- 284
- 285
- 286
- 287
- 288
- 289
- 290
- 291
- 292
- 293

LISTA DE ANEXOS

294

295

Anexo 1 Composição do diluidor TRIS/GEMA a 20%..... 67

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

327

328

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
mL	Mililitro
mM	Micromolar
pmol/ml	Picomol por mililitro
μM	Micromolar
μL	Micro litro
mM/ml	Micromolar por mililitro
ng/ml	Nanograma por mililitro
Kg	Quilograma
°C/min	Grau Celsius por minuto
X±S.D.	Média e desvio padrão
ATP	Adenosina trifosfato
BE	Benzoato de Estradiol
Cu ⁺	Íon de Cobre
-CH ₂	Grupo metileno
CO ₂	Dióxido de Carbono
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
DIC	Contraste Diferencial Interferencial
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
eCG	Gonadotropina Coriônica Equina
ECP	Cipionato de Estradiol
Fe ⁺⁺	Íon de ferro
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Foliculo Estimulante
FITC-PSA	Isocianato de Fluoresceína – <i>Pisum sativum</i> .
GnRH	Hormônio liberador de gonadotropina
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSH-Rd	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
hCG	Gonodotrofina coriônica humana
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP1-6	Insulin-like Growth Factor Binding Protein

IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em tempo fixo
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazoliliodeto carbocianina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteolítico
MDA	Malonaldeído
NADPH	Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH-oxidase	Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase
NADPH-oxido-redutase	Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxido-redutase
O_2^-	Ânion Superóxido
OH^-	Radical Hidroxila
PI	Iodeto de Propídeo
PGF2 α	Prostaglandina F2 alfa
pH	Potencial Hidrogeniônico
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
SOD –	Superóxido Dismutase
SO –	Superóxido
-SH –	Grupo tiol
TBARS –	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBA –	Ácido Tiobarbitúrico
TTRr	Teste de Termorresistência Rápido

329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347

Sumário

348		
349	INTRODUÇÃO.....	17
350	REVISÃO DE LITERATURA	18
351	2.1 Criopreservação espermática	18
352	2.2 Ação dos diluidores sobre a criopreservação	20
353	2.3 Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e estresse oxidativo	23
354	2.4 Antioxidantes	28
355	2.4.1 Glutathione	31
356	2.5 Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo – 1 (IGF-1)	34
357	3. HIPÓTESE	36
358	4. OBJETIVOS	36
359	4.1 Geral.....	36
360	4.2 Específicos	36
361	5. MATERIAL E MÉTODOS	37
362	5.1 Local.....	37
363	5.2 Animais.....	37
364	5.3 Delineamento experimental	38
365	5.4 Coleta e análise do sêmen pré-criopreservação.....	38
366	5.5 Criopreservação do sêmen	39
367	5.6 Análise do sêmen pós-criopreservação.....	40
368	5.6.1 Análise da morfologia espermática	40
369	5.6.2 Análises da integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial	
370	e estresse oxidativo.....	41
371	5.7 Avaliação da fertilidade do sêmen: inseminação e taxa de concepção.....	42
372	5.8 Análise Estatística	42
373	6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
374	6.1 Análises preliminares	43
375	6.2 Análises após a criopreservação.....	43

376	a. Motilidade e Vigor espermático	43
377	b. Morfologia espermática	45
378	c. Teste de termorresistência rápido	47
379	d. Avaliação das membranas espermáticas	48
380	e. Estresse oxidativo	50
381	f. Taxa de Gestação	53
382	7. CONCLUSÃO.....	54
383	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	55
384	ANEXOS	67

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404 **INTRODUÇÃO**

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

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

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

419 Porém, para que ocorra uma resposta melhor da IA, vários estudos vem sendo
420 direcionados à criopreservação espermática, por ser caracterizada como um processo de
421 grande estresse celular, pois a diluição do sêmen, geralmente é utilizada e promove a
422 redução da concentração de antioxidantes e hormônios, resultando no desequilíbrio
423 entre oxidantes, antioxidantes e hormônios. Conseqüentemente, ocorre o estresse celular
424 e diminuição da motilidade, impondo aos espermatozoides condições extremamente
425 desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade (Bilodeau et al., 2000).

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

432 O IGF-1 testicular tem um papel determinante no desenvolvimento e
433 diferenciação das células de Leydig e das células germinativas, a falta dessa substância
434 nos testículos pode induzir infertilidade, uma vez que atua tanto na preservação da
435 membrana plasmática da célula espermática, como na sua motilidade (Gnessi et al.,
436 1997).

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

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

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

455

456 **REVISÃO DE LITERATURA**

457 2.1 Criopreservação espermática

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

465 Desta forma, a criopreservação espermática, além de possibilitar sua utilização
466 por período prolongado e suspender o metabolismo espermático mantendo o potencial
467 fecundante dos espermatozoides, tem sido amplamente utilizada para aumentar o
468 potencial reprodutivo de touros de alto valor genético, sendo ferramenta imprescindível
469 em programas de inseminação artificial, transferência e produção *in vitro* de embriões.

470 Onde o uso do sêmen congelado permite rápido avanço genético dos rebanhos
471 comerciais, permitindo a escolha de reprodutores que melhor atendam às necessidades
472 de produção (Amann e Pickett, 1987; Castelo et al., 2008; Leite et al., 2011).

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

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

488 O primeiro momento de estresse do espermatozoide se dá durante a fase de
489 transição da membrana plasmática do estado normal em temperatura ambiente para o
490 estado cristalino ou gel quando é exposta a temperatura de refrigeração a 5 °C. Quando
491 o resfriamento é realizado de uma forma muito rápida, entre 30 °C e 0 °C, algumas
492 células são induzidas a um estresse letal chamado de choque frio, sendo mais crítico
493 quando são expostas na faixa de temperatura de 12 a 2 °C (Watson, 1995; Gonzalez,
494 2004).

495 O choque frio ou choque térmico é observado quando os espermatozoides se
496 encontram com movimentos circulares, alterações ou diminuição da motilidade
497 espermática, decréscimo da produção de energia, redução da taxa de glicose e
498 respiração celular, tendo perdas de moléculas e íons para o meio extracelular causado
499 pelo aumento da permeabilidade da membrana. Todas essas alterações são originadas
500 devido aos danos ocorridos na membrana espermática que, bioquimicamente, são
501 diferentes. Pois, podem apresentar particularidades que influenciam na fluidez da
502 membrana como a quantidade de colesterol e o grau de saturação dos ácidos graxos
503 presentes na membrana, mas os constituintes estruturais são iguais para todas as

504 espécies. Porém, o choque frio pode variar de acordo com o grau de maturação dos
505 espermatozoides, variação de cada indivíduo, ejaculado, espécie e quantidade de plasma
506 seminal (Amann e Pickett, 1987;Cottorello, 2002; Gonzalez, 2004; Celeghini, 2005).

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

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

526 Por outro lado, o descongelamento vai ser realizado de acordo com a taxa de
527 congelamento que foi realizada. Pois, os espermatozoides necessitam de curvas
528 adequadas para serem descongeladas a fim de não causar danos letais às células. Neste
529 caso, se a congelação foi realizada de forma rápida e a descongelação de forma lenta,
530 pode ocorrer uma lesão mecânica da membrana, pois o gelo intracelular pode ser
531 recristalizado em cristais menores. Já se a congelação foi lenta e a descongelação rápida
532 a água do meio extracelular vai entrar de uma forma muito rápida no meio intracelular
533 causando um rompimento da membrana celular (Squires et al., 1999; Leite et al., 2011).

534 2.2 Ações dos diluidores sobre a criopreservação

535 Para que o sêmen possa ser conservado, ele deve ser devidamente diluído,
536 podendo ter sua durabilidade estendida e ser transportado. Assim, a composição do

537 diluidor é de extrema importância para os espermatozoides sobreviverem ao processo de
538 criopreservação, pois o mesmo tem a função de proteger a membrana plasmática do
539 espermatozoide contra o choque térmico e as injúrias mecânicas causadas pela
540 manipulação, além de possuir a função de fornecer nutrientes e estabilizar o pH do meio
541 (Verstegen et al., 2005; Chaveiro et al., 2006).

542 Portanto, para o espermatozoide manter sua capacidade de fecundar o gameta
543 feminino após o processo de congelamento e descongelamento é necessário que as suas
544 características sejam preservadas, como: manter o metabolismo para produção de
545 energia, a motilidade progressiva, a preservação das enzimas localizadas na região do
546 acrossoma e as proteínas da membrana plasmática, que são importantes na estruturação
547 da membrana. Assim, o diluidor deve possuir algumas características essenciais como
548 ser atóxico, apresentar substâncias iônicas e não iônicas para manter a osmolaridade,
549 baixo custo, uma fonte lipoproteica de alto peso molecular para proteger contra o
550 choque térmico, como os crioprotetores e outros aditivos como antioxidantes,
551 hormônios e antibióticos (Amann e Pickett, 1987; Vishwanath e Shannon, 2000; Aisen
552 2008).

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

559 Portanto, algumas substâncias foram estudadas nos diluidores com o intuito de
560 diminuir os danos causados durante a criopreservação. Apesar do mecanismo de ação
561 não está totalmente elucidado, acredita-se que estes agentes sejam responsáveis por
562 reduzir o ponto de congelamento da solução, na qual é determinado com a diminuição
563 da temperatura (Soares e Guerra, 2009). Além disso, alguns crioprotetores podem
564 possuir fatores tóxicos aos espermatozoides, onde em elevadas quantidades pode
565 interferir na capacidade fecundante do gameta, se tornando impróprio para os
566 espermatozoides. Entretanto, próprio para outros tipos de células (Graham, 1996;
567 Watson, 2000).

568 Os crioprotetores podem ser divididos em duas categorias, sendo eles:
569 penetrantes ou não penetrantes. Essa classificação vai ocorrer de acordo com o local de

570 atuação deles, podendo ser na região intra ou extracelular (Sztein, 2001; Celeghini,
571 2005).

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

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

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

596 Dentre os crioprotetores não penetrantes, a gema de ovo se destaca por ser o
597 agente com boas respostas para proteção do espermatozoide contra o choque frio,
598 mantendo a fertilidade dessas células após o congelamento e descongelamento, além de
599 suas funções espermáticas (Bergeron et al., 2004). Entretanto, apesar do seu uso
600 contínuo nos diluidores, o mecanismo de ação na proteção dos espermatozoides não está
601 totalmente elucidado (Holt, 2000).

602 As lipoproteínas de baixa densidade (LDL), presentes na gema de ovo, tem ação
603 na superfície da membrana plasmática dos espermatozoides através de interações com

604 os fosfolipídios, promovendo alterações na membrana para que ela não tenha rupturas
605 durante o processo de criopreservação (Moussa et al., 2002; Farstad, 1996). Apesar da
606 importância desse crioprotetor, a gema de ovo consiste de um material biológico capaz
607 de veicular microrganismos, dependendo da sua origem (Farstad, 2009). Assim, estudos
608 com outros crioprotetores vêm sendo usados para substituir a gema de ovo, como:
609 lecitinas de soja (Hiwasa et al., 2009), adição de trealose, glicina (Valente et al., 2010) e
610 leite (Bergeron et al., 2007). Embora os resultados muitas vezes sejam inferiores aos
611 encontrados com o uso da gema de ovo no meio diluidor (Silva e Guerra, 2011).

612

613 2.3 Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e estresse oxidativo

614 Os primeiros relatos sobre estresse oxidativo se deram em 1943, por Jon
615 MacLeod, onde ao incubar os espermatozoides de seres humanos em condições de alta
616 tensão de oxigênio, foi observado que a motilidade espermática foi diminuindo,
617 podendo ser revertido com a adição da catalase. Assim, concluirão que os
618 espermatozoides de mamíferos têm a capacidade de gerar peróxido de hidrogênio,
619 podendo prejudicar a motilidade dos espermatozoides (Aitken et al., 2013). Alguns anos
620 depois, em 1946, as primeiras informações em espermatozoides bovinos foram
621 publicadas onde foram confirmados os efeitos que a catalase e a peroxidase exercem
622 sobre a manutenção da motilidade. Levando os autores a concluir que o peróxido de
623 hidrogênio possui efeitos citotóxicos capaz de alterar o metabolismo e motilidade dos
624 espermatozoides (Tosic e Walton, 1950).

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

633 Os radicais O_2^- são formados da adição de um elétron nas moléculas de
634 oxigênio. Por ser um radical produzido principalmente na membrana mitocondrial, tem
635 como seu campo de ação o local onde foi produzido, agindo pouco sobre as membranas
636 lipídicas. Durante o processo de respiração celular ocorre a produção desse radical, além

637 das reações com flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (Nordberg e Arnér,
638 2001).

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

646 As ROS exercem tanto funções fisiológicas como patológicas nas células
647 espermatóicas. Essa atuação está associada tanto ao momento em que ela foi produzida,
648 quanto à concentração, ao tempo que essas células foram expostas, associados a fatores
649 extracelulares, como: temperatura e ambiente (Besalsky, 2002). Desta forma, as ROS,
650 quando em concentrações reduzidas, são importantes para o controle e sinalização do
651 crescimento celular, ao ataque de patógenos invasores, síntese enzimática de processos
652 bioativos e detoxificação de substâncias estranhas (Soares e Guerra, 2009; Borges et al.,
653 2011).

654 Nos machos, desde as primeiras fases do desenvolvimento das células
655 germinativas, quando já são capazes de produzir pequenas quantidades de ROS, elas
656 estão envolvidas na condensação da cromatina dos espermatozoides, adaptando o
657 núcleo das células germinativas por indução da apoptose ou pela proliferação das
658 espermatogônias (Fisher e Aitken, 1997; Aitken, 1999). Nos espermatozoides maduros,
659 as ROS vão atuar diretamente na fertilidade, sendo responsáveis pelos processos de
660 capacitação espermática, hiperativação, reação acrossômica, estabilidade da bainha
661 mitocondrial, motilidade espermática bem como a ligação espermática à zona pelúcida
662 (Soares e Guerra, 2009; Borges et al., 2011; Walczak-Jedrzejowska et al., 2013).

663 Quanto aos mecanismos bioquímicos de produção das ROS, ainda não estão
664 totalmente elucidados. Porém, relatos de Aitken (1995), informam que em
665 espermatozoides humanos uma das principais fontes de produção do O_2^- é através da
666 nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato NADPH, estando envolvida no ciclo da
667 NADPH-oxidase, demonstrando que os espermatozoides humanos possuem uma
668 variedade de sistemas de transporte de elétrons, estando localizados na superfície celular
669 podendo ser removidos facilmente pela atividade das enzimas NADPH (Aitken, 2003).
670 Entretanto, De Lamirande e Lamothe (2009), avaliando as células espermáticas

671 humanas através da técnica de *imuno blotting*, não encontraram relação entre a NADPH
672 oxidase e a produção de O_2^- .

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

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

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

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

699 Nichi et al. (2007), ao realizarem experimento com espermatozoide de bovinos
700 coletados direto do epidídimo e submetidos a dois métodos de conservação, constataram
701 que os espermatozoides com gota citoplasmática proximal apresentaram maior
702 produção de ROS e foram mais susceptíveis ao estresse oxidativo do que os com gotas
703 citoplasmáticas distais. Segundo Misro et al. (2004), seres humanos que apresentam
704 muitos espermatozoides anormais produzem concentrações moderadamente elevadas de

705 H₂O₂, causando imobilização dos espermatozoides, principalmente pela depleção de
706 ATP intracelular com diminuição da fosforilação das proteínas do axonema, além de
707 induzir a peroxidação lipídica e resultar em morte celular.

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

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

720 Baumber et al. (2002), ao adicionarem neutrófilos ativados ao sêmen de equinos,
721 observaram que quanto maior a quantidade de neutrófilos presentes, maior a quantidade
722 de ROS produzido e menor a motilidade espermática. Assim, determinaram que a
723 quantidade de 5x10⁶ de neutrófilos ativados/mL é o suficiente pra ter uma produção
724 excessiva de H₂O₂ e reduzir a motilidade dos espermatozoides equinos *in vitro*.

725 Já quando a quantidade de ROS produzida é superior às necessidades das
726 células, ocorre à geração do estresse oxidativo (Aitken, 1995), que é causado pelo
727 desequilíbrio entre a produção dos chamados ROS e a ação protetora do sistema
728 antioxidante, responsável por sua neutralização e remoção. Um excesso de ROS
729 provoca uma resposta patológica que conduz à lesão de células e tecidos. Os
730 espermatozoides são, particularmente, suscetíveis aos efeitos nocivos do ROS, porque
731 os seus componentes, da membrana celular, contêm grande quantidade de ácidos graxos
732 poli-insaturados (Walczak-Jedrzejowska et al., 2013). Portanto, é de fundamental
733 importância detectar a quantidade de ROS produzido, devido aos danos que podem
734 causar (De Lamirande e Gagnon, 1993; Alves et al., 2015).

735 Esses ácidos podem ser oxidados através de reações de peroxidação lipídica,
736 onde o citoplasma das células possui pequenas concentrações de enzimas que
737 neutralizam as ROS. Assim, a oxidação dos lipídeos é um processo que conduz a perda
738 da integridade da membrana, o aumento da sua permeabilidade, a inativação das

739 enzimas celulares, os danos no DNA estrutural e a apoptose celular (Henkel e Schill,
740 1998; Sanocka-Maciejewska, 2005; Schuppe et al., 2008).

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

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

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

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

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

782 Porém, outros fatores podem está envolvidos na peroxidação como variações de
783 temperatura ou pH e, assim, produzir quantidades superiores de malonaldeído que
784 promovem interpretações com relação às ROS de forma incorreta (Janero, 1990).

785 Desta maneira, diante de buscas por novos métodos de avaliação do estresse
786 oxidativo presente nas células espermáticas, a sonda CellROX Deep Red tem sido
787 associada com outras sondas fluorescentes, possibilitando quantificar os ROS presente
788 nas células, pois é capaz de identificar o radical hidroxila de forma mais fácil e intensa
789 do que o superóxido (Ahn et al., 2012; Grinberg, 2013).

790 A sonda CellROX Deep Red, foi utilizada pela primeira vez em células
791 espermáticas por Alves et al. (2015), após a validação da sonda fluorescente para
792 avaliar o estresse oxidativo das células espermáticas de ovinos. Assim, ao quantificar as
793 ROS presentes no sêmen de carneiros induzidos *in vitro* ao estresse oxidativo através do
794 uso de Sulfato Ferroso (FeSO₄) e ascorbato de sódio, além de induzir o estresse *in vivo*,
795 concluiu-se que o CellROX Deep Red é eficiente na detecção da produção de ROS nas
796 células espermáticas sob estresse oxidativo induzido *in vitro* e *in vivo*, sendo de grande
797 importância para o diagnóstico de problemas reprodutivos.

798

799 2.4 Antioxidantes

800 Como a criopreservação espermática causa aumento da produção de ROS,
801 assim como o processo de capacitação espermático aumenta a permeabilidade da
802 membrana acelerando a geração de ROS, os antioxidantes vêm sendo estudados ao
803 longo do tempo com o objetivo de melhorar os índices de fertilidade, visando à
804 manutenção da integridade dos espermatozoides submetidos ao processo de refrigeração

805 e congelamento, através da redução das injúrias causadas pelo estresse oxidativo (Silva e
806 Guerra, 2011).

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

813 A prévia diluição do sêmen para os processos de criopreservação promove uma
814 diminuição da concentração dos antioxidantes presentes no plasma seminal,
815 ocasionando desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Assim, estudos recentes
816 mostram que a suplementação dos diluidores com antioxidantes tem obtido resultados
817 significativos na manutenção da motilidade espermática e na integridade da membrana
818 após a descongelamento do sêmen de bovinos, caprinos, ovinos, caninos e de humanos
819 (Bucak et al., 2010b). Porém, a suplementação dos espermatozoides com antioxidante
820 no momento da fertilização *in vitro* prejudicou a qualidade dos espermatozoides
821 bovinos, a formação de pronúcleos normais e o desenvolvimento para o estágio de
822 blastocisto (Gonçalves et al., 2010).

823 Estudos demonstram que os antioxidantes são responsáveis por proteger os
824 espermatozoides contra as ROS produzidas por espermatozoides ou por leucócitos
825 presentes no sêmen. Tendo assim, a função de prevenir a fragmentação do DNA,
826 melhorar a qualidade do sêmen em seres humanos fumantes, reduzir os efeitos da
827 criopreservação, evitar que ocorra a peroxidação lipídica e reduzir as alterações na
828 composição das membranas (Zini et al., 1993).

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

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

842 A superóxido desmutase (SOD) é uma enzima que elimina os ânions superóxido,
843 dismutando em oxigênio e H_2O_2 , tanto no meio intracelular quanto extracelular
844 (Nishikimi e Machlin, 1975). Na forma intracelular pode está de duas formas, sendo na
845 forma de SOD de cobre-zinco localizada, principalmente, no citoplasma contendo cobre
846 e zinco no centro ativo ou o SOD de manganês, que está localizado principalmente na
847 matriz mitocondrial com manganês no seu centro ativo. Na forma extracelular atua com
848 os polissacarídeos de superfície, podendo está na forma livre. Para a SOD agir contra
849 H_2O_2 , deve ser conjugada com a catalase ou GSH-Px (Walczak-Jedrzejowska et al.
850 2013). Além disso, ela impede a hiperativação prematura e capacitação induzida por
851 radicais superóxido antes da ejaculação (De Lamirande e Gagnon, 1993).

852 A catalase corresponde a uma enzima oxirredutora que decompõe o H_2O_2 em
853 duas moléculas de água e uma de oxigênio. O H_2O_2 é altamente tóxico para a célula,
854 uma vez que é o principal precursor da formação de radicais OH^- (Ortega et al., 2003;
855 Barretos et al., 2006). Além disso, está relacionado com a capacitação espermática
856 induzida por óxido nítrico, que consiste em um mecanismo complexo usando peróxido
857 de hidrogênio (De Lamirande e Gagnon, 2008).

858 Outro antioxidante enzimático é o sistema GSH-Px e GSH-Rd, sendo a
859 peroxidase responsável por atuar sobre o H_2O_2 dando origem a duas moléculas de água
860 e uma de glutathione oxidada. Já a GSH-Rd converte a glutathione oxidada junto com uma
861 molécula de hidrogênio na presença da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada
862 (NADPH), em duas moléculas de GSH e NADP (Christophersen, 1968; Silva e Guerra,
863 2011).

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

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

873 A vitamina E (α -tocoferol) é um composto químico orgânico solúvel em gordura
874 localizado principalmente na membrana celular onde sua atividade antioxidante está
875 relacionada à captura de radicais de SO e hidroxilas livres. Assim, ela previne a célula
876 espermática contra danos, diminuindo a produção de ROS (Walczak-Jedrzejowska et al.
877 2013). Dentro do leque de agentes antioxidantes não enzimáticos, ainda há a cisteína,
878 que é um ácido de baixo peso molecular precursor da glutathione, onde adentra a
879 membrana celular facilmente, melhorando a biossíntese de GSH intracelular tanto *in*
880 *vivo* quanto *in vitro*. Além disso, protege os lipídios da membrana e proteínas devido às
881 suas propriedades de eliminação dos radicais indiretos (Uysay e Bucak, 2007). Com
882 relação à trealose e a taurina, segundo Reddy et al. (2010), quando adicionaram essas
883 substâncias sulfuradas aos espermatozoides de bubalinos, observaram que ocorreu uma
884 proteção contras as ROS, após a criopreservação.

885 Ressalva-se que os efeitos dos antioxidantes quando usados nos diluidores
886 podem variar de acordo com a quantidade colocada, além da quantidade de ROS
887 presente que precisa ser inativado. Assim, os antioxidantes como a vitamina E podem
888 apresentar o efeito antioxidante ou se em quantidades superiores, podem estimular a
889 oxidação (Valença e Guerra, 2007).

890 2.4.1 Glutathione

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

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

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

916 Em suínos Gadea et al. (2004), analisando a concentração de GSH no plasma
917 seminal no ejaculado e depois que ele foi submetido a criopreservação, observaram que
918 ocorreu uma redução de 32% de GSH após a criopreservação. No sêmen de bovinos foi
919 observada uma redução de 78% da concentração de GSH, após este processo (Bilodeau
920 et al., 2000).

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

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

934 Soares et al. (2011), visando avaliar o efeito da GSH no sêmen de caprinos
935 criopreservados com diluidor a base de leite desnatado, acrescentaram 2mM, 5mM e
936 7mM/mL de GSH no diluidor. Após a criopreservação foi avaliado a integridade das
937 membranas e o potencial da membrana mitocondrial, onde foi observado que as
938 diferentes concentrações de GSH adicionadas ao diluidor não conseguiu preservar a

939 integridade dos espermatozoides. Assim como, Silva et al. (2012), ao trabalharem com a
940 concentração de 5mM de GSH no diluidor a base de leite desnatado submetido a
941 diferentes períodos de estabilização, observaram que à adição não interferiu na
942 qualidade dos espermatozoides de caprinos submetidos ao processo de criopreservação
943 com diferentes tempos de estabilização. Já Soares et al. (2009), ao trabalharem com
944 sêmen de caprino, observaram que a melhor resposta se deu quando adicionaram a
945 concentração de 2mM de GSH.

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

952 Em bovinos foi observado que os tiois GSH/GSH-Px e GSH-Rd nas
953 concentrações acima de 0,5mM foram capazes de manter a motilidade dos
954 espermatozoides diluídos e criopreservados no diluidor TRIS. Após o descongelamento
955 foram incubados durante 6 horas a 38,5 °C em CO₂ na ausência de uma fonte externa de
956 estresse oxidativo, conseguindo manter a motilidade (Bilodeau et al., 2001).

957 Tuncer et al. (2010), ao realizarem avaliações no sêmen de bovinos
958 criopreservados com diluidores acrescidos de GSH (0,5 e 2,0mM) e cisteína (5 e
959 10mM), observaram que a morfologia pós descongelamento, motilidade progressiva
960 bem como as outras características da motilidade espermática não tiveram diferença
961 significativa em comparação com o grupo controle. Ao avaliar a taxa de gestação de
962 233 vacas inseminadas com as amostras congeladas com os antioxidantes foi observado
963 que não ocorreu diferença entre a taxa de gestação dos diferentes grupos (GSH com 0,5
964 e 2,0mM/ Cisteína com 5 e 10mM).

965 Já Sariozkan et al. (2009), ao avaliarem o efeito da GSH com a concentração de
966 2mM no sêmen de bovinos da raça Holandêsa, criopreservados com diluidor Bioxcell,
967 observaram melhora nas características seminais quando compararam com o grupo
968 controle. Porém, na taxa de gestação dos animais inseminados com GSH, não obtiveram
969 diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com controle.

970 Song et al. (2012), trabalhando com sêmen de búfalos criopreservado com
971 0,75mM de GSH, realizaram FIV, obtendo 13,67% de blastocistos, sendo superior ao
972 controle 9,74%, possuindo qualidade de desenvolvimento embrionário, além de

973 melhorar a qualidade espermática. Assim, sugeriram que o uso desse antioxidante nessa
974 concentração pode ter elevado potencial de aplicação comercial para bubalinos. Ansari
975 et al. (2014), observaram que quando o sêmen de búfalos foi submetido a refrigeração à
976 5 °C na concentração de 0,5 e 1,0mM de GSH, foi possível manter a motilidade,
977 viabilidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides.

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

981 2.5 Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo – 1 (IGF-1)

982 Os fatores de crescimento consistem em peptídeos caracterizados por possuir
983 alto peso molecular lançado na circulação sanguínea de mamíferos através do fígado ou
984 pela produção local realizada por vários tecidos. Devido o seu alto peso é necessário
985 que uma proteína carreadora, chamada de *Insulin-like Growth Factor Binding Protein*
986 (IGFBP1-6), transporte os IGFs para diversas regiões do corpo, sendo assim,
987 responsáveis por regular a biodisponibilidade, se ligando aos receptores (Bartke, 2000).

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

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

998 Nos testículos, o IGF-1 é produzido a partir das células de Sertoli e Leydig, sob
999 o controle de FSH e LH, respectivamente (Spiteri-Grech et al., 1992; Lin, 1995;
1000 Lejeune et al., 1996). Podendo estimular a esteroidogênese por aumentar a densidade de
1001 receptores para gonodotropinas e a expressão de enzimas importantes para esse
1002 metabolismo (Spiteri-Grech e Nieschlag, 1993). Além disso, ele autorregula a
1003 produção de testosterona e possui funções semelhantes à da insulina onde é responsável
1004 pela captação de glicose e ativação da síntese proteica (Ruckebusch; Phaneuf; Dunlop,
1005 1991; Wang e Hardy, 2004).

1006 Em suínos e outros animais existem estudos que demonstra que o efeito do IGF-
1007 1 está relacionado à multiplicação e diferenciação das células responsáveis pela
1008 produção de testosterona. Assim, está diretamente associado às células de Leydig, a
1009 produção de testosterona, aumentando o número de receptores de LH nas células
1010 (Gelber et al., 1992).

1011 Esta substância atua como um ativador do metabolismo espermático onde está
1012 envolvido no movimento celular (motilidade e intensidade de movimento), aumentando
1013 o metabolismo de hidratos de carbono e, conseqüentemente, a capacidade de
1014 fecundação dos espermatozoides (Selvaraju et al., 2009). Contudo, o metabolismo da
1015 energia celular está relacionado com a geração de maior quantidade de radicais livres, o
1016 que poderia afetar a qualidade do sêmen e a capacidade fecundante dos espermatozoides
1017 (O'Flaherty et al., 1997).

1018 Alguns estudos têm demonstrado que o IGF-I está presente no plasma seminal,
1019 enquanto que os receptores correspondentes foram detectados em espermatozoides de
1020 suínos (Hirai et al., 2001) e coelhos (Minelli et al., 2001). Também tem sido
1021 demonstrado que, imediatamente após a adição desse hormônio no sêmen, a qualidade
1022 do esperma é melhorada em equinos (MacPherson et al., 2002), búfalo (Selvaraju et al.,
1023 2009) e suínos (Silva et al., 2011).

1024 Brito et al. (2007) avaliaram o efeito da nutrição de touros associando as
1025 concentrações de IGF-1 ao desenvolvimento sexual e relataram que com a diminuição
1026 da concentração do IGF-1 ocorreu uma queda na concentração de testosterona. Também
1027 demonstraram que existem fortes associações positivas entre a concentração de IGF-1 e
1028 o tamanho dos testículos, sugerindo que o fator de crescimento pode ter efeitos
1029 mitogênicos diretos sobre esse órgão. Portanto, este hormônio pode regular não só a
1030 esteroidogênese testicular, mas também a proliferação celular em determinada fase de
1031 vida do animal.

1032 Henricks et al. (1998), observando a presença de IGF-1 no plasma seminal de
1033 bovinos e sua relação com a motilidade dos espermatozoides, relataram que a
1034 concentração de IGF-1 no plasma seminal de bovinos pode variar entre touros e
1035 ejaculados, mas a concentração média encontrada foi de 116,29 ng/mL. Além disso,
1036 demonstraram que ao adicionar 100ng/mL de IGF-1 e avaliar a porcentagem de
1037 espermatozoides móveis e a velocidade em linha reta, foram superiores quando
1038 comparados com o controle. Levando a concluir que o IGF estimula a motilidade
1039 espermática podendo está envolvido no processo de fecundação na espécie bovina.

1040 O mesmo foi encontrado em bubalinos, onde ao avaliarem a adição de
1041 100ng/mL de IGF-1 ao sêmen criopreservado, observaram que a adição do fator de
1042 crescimento proporcionou um aumento da velocidade retilínea e da motilidade dos
1043 espermatozoides, além de ter aumentado o número de espermatozoides com integridade
1044 de membrana após 30 e 60 minutos de incubação e promovido uma diminuição da
1045 peroxidação lipídica nos grupos com 90 e 120 minutos de incubação a 37 °C quando
1046 comparados com o grupo controle (Selveraju et al., 2009).

1047 Já em ovinos, Padilha et al. (2012), ao avaliarem diferentes concentrações de
1048 IGF-1, observaram que os tratamentos com 100 e 250ng/mL de IGF-1 foram superiores
1049 ao controle com relação a motilidade e viabilidade espermática após uma hora do
1050 descongelamento. Porém, não teve diferença na integridade acrossomal e da membrana
1051 plasmática, além da taxa de gestação.

1052 Uma vez que o receptor de IGF possui atividade tirosina quinase e seu ligante
1053 está presente no plasma seminal, o sistema IGF-I pode estar envolvido no sinal de
1054 transdução, conduzindo ao aumento da motilidade, a capacitação espermática e
1055 exocitose acrossômica (Gupta, 2005).

1056 A associação da concentração plasmática de IGF-I no sêmen com a motilidade
1057 e a morfologia dos espermatozoides, sugere que o IGF-I possa desempenhar um papel
1058 crucial na função espermática (Macpherson et al., 2002).

1059

1060 **3. HIPÓTESE**

1061 A adição de Glutathione e IGF-1 no meio diluidor para congelamento de sêmen
1062 bovino propicia maior qualidade, metabólica e estrutural, das células espermáticas após
1063 o descongelamento, aumentando a taxa de concepção.

1064

1065 **4. OBJETIVOS**

1066 4.1 Geral

1067 Avaliar a taxa de concepção, as condições metabólica e estrutural das células
1068 espermáticas bovinas após a congelamento, utilizando meios diluidores acrescidos de IGF-
1069 1 e Glutathione.

1070 4.2 Específicos

1071 1- Analisar o sêmen de touros da raça Nelore;

- 1072 2- Avaliar a morfologia espermática após a criopreservação, classificando os
1073 defeitos;
- 1074 3- Determinar o efeito dos tratamentos quanto a integridade das membranas,
1075 plasmática e acrossomal, após a criopreservação;
- 1076 4- Determinar se o acréscimo de Glutathione e/ou IGF-1 no meio extensor de
1077 congelação diminui a taxa de células espermáticas com estresse oxidativo após o
1078 descongelamento;
- 1079 5- Avaliar o efeito do antioxidante, Glutathione reduzida, por meio dos testes
1080 funcionais e computadorizados;
- 1081 6- Verificar se concentrações elevadas de IGF-1 no meio diluidor favorece a
1082 motilidade da célula espermática após a criopreservação;
- 1083 7- Determinar se o acréscimo de Glutathione e/ou IGF-1 no meio de congelação
1084 aumenta a taxa de gestação.

1085

1086 **5. MATERIAL E MÉTODOS**

1087 O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do
1088 Acre, sob o número 049/2015.

1089 5.1 Local

1090 A primeira etapa do estudo foi realizada em uma fazenda de gado de corte da
1091 raça Nelore no município de Grajaú, Fazenda Soberana, localizada a -03° 40' 00" de
1092 latitude e -45° 22' 48" de longitude, tendo clima tropical úmido. As análises
1093 laboratoriais, após execução da primeira etapa, foram realizadas nos Laboratórios de
1094 Reprodução Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do
1095 Maranhão e da Universidade de São Paulo.

1096 A segunda etapa, que consistiu na inseminações artificial, foi realizada na
1097 propriedade rural supracitada.

1098

1099 5.2 Animais

1100 Foram utilizados seis touros Nelores, com peso e idade médios de 500 kg e 30
1101 meses, respectivamente. Classificados como aptos à reprodução, segundo o colégio
1102 brasileiro de reprodução animal (Henry e Neves, 1998). Todos os animais alocados no
1103 experimento passaram por exame andrológico previamente, sendo o ejaculado
1104 subdividido entre os tratamentos, bloqueando o efeito individual de cada unidade

1105 experimental sobre os tratamentos, sendo que todos os animais passaram por uma
1106 repetição totalizando, assim, 12 ejaculados.

1107 Para a avaliação da fertilidade do sêmen foram utilizadas 240 novilhas, sendo
1108 que os animais foram distribuídos igualmente entre os tratamentos, bloqueando a categoria
1109 utilizada. Os animais passaram por avaliação ginecológica, por meio de
1110 ultrassonografia, antes de serem alocados no experimento. Após 45 dias da inseminação
1111 todos os animais passaram por nova avaliação ultrassonográfica para diagnóstico de
1112 gestação.

1113 5.3 Delineamento experimental

1114 Foi utilizado o meio diluidor TRIS, a base de gema de ovo, sendo dividido em
1115 quatro tratamentos: TI - controle, TII - meio acrescido com Glutathione (2mM/mL), TIII
1116 - IGF-1 (100ng/mL), TIV - Glutathione (1mM/ml) + IGF-1 (50ng/ml).

1117 Neste experimento foi criopreservado apenas dois ejaculados por touro, e apenas
1118 os que apresentaram motilidade igual ou superior a 70% de motilidade total e vigor
1119 mínimo de 3 (escala de 1-5), bloqueando o efeito do touro.

1120 Para cada tratamento foram congeladas 30 palhetas de sêmen por
1121 tratamento/ejaculado, sendo utilizadas 10 palhetas para a inseminação e 20 para as
1122 avaliações laboratoriais.

1123 5.4 Coleta e análise do sêmen pré-criopreservação

1124 As coletas de sêmen dos touros foram realizadas por eletroejaculação, sendo
1125 realizada higienização do prepúcio antes de cada coleta, externamente com água e
1126 internamente com solução fisiológica, para evitar possíveis contaminações.

1127 Logo após a coleta, foram realizadas as análises físicas e morfológicas de rotina.
1128 Cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor e
1129 morfologia espermática. Todo material utilizado na coleta e avaliação do sêmen foi
1130 mantido aquecido a 37 °C, para evitar choque térmico e alterações das características do
1131 sêmen.

1132 No momento da coleta o tubo coletor foi revestido por um recipiente de isopor
1133 envolvido com papel alumínio, para evitar o choque térmico. O volume foi avaliado
1134 pela leitura direta no tubo de coleta graduado. A concentração foi avaliada coletando-se
1135 uma amostra do sêmen e diluindo-se na proporção 1:100, em uma solução de formol-

1136 salina tamponada e a contagem foi realizada por meio da câmara de Neubauer
1137 utilizando-se microscopia óptica com aumento de 400 vezes.

1138 A motilidade e vigor foram avaliados subjetivamente, por meio de duplo cego
1139 (avaliação independente de dois avaliadores, sem comunicação prévia), em preparação
1140 de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas, a 37 °C), por meio de
1141 microscopia óptica, em aumento de 100x; a motilidade foi expressa em porcentagem de
1142 espermatozoides móveis; enquanto que o vigor, que se refere à velocidade progressiva
1143 das células em movimento, foi classificada em escores de 1 a 5, sendo o escore 1, o
1144 mais lento, e o escore 5, correspondendo ao mais rápido movimento progressivo
1145 uniforme.

1146 Para a avaliação da morfologia espermática uma alíquota do ejaculado foi
1147 diluída em formol-salina tamponada, previamente aquecido (37 °C), para fixação e
1148 avaliado posteriormente, em laboratório, por meio de preparações úmidas, sob
1149 microscopia de contraste de fase (Microscópio Nikon Eclipse 50i), com aumento de
1150 1000x, contando-se 200 células.

1151 5.5 Criopreservação do sêmen

1152 Após a avaliação da motilidade e vigor das amostras de sêmen, o ejaculado de
1153 cada touro foi dividido em quatro alíquotas (tratamentos) de mesmo volume, em tubos
1154 cônicos de 15 mL, e foram diluídas, utilizando-se IGF-1 e/ou Glutathione. A diluição foi
1155 realizada em banho maria à temperatura de 36 °C, atingindo uma concentração de 100 x
1156 10⁶ sptzs/mL e os tubos foram identificados quanto ao hormônio utilizado. O diluidor
1157 TRIS (fração única; Anexo 01) foi previamente preparado no Laboratório de
1158 Reprodução Animal da EV-UEMA, utilizando materiais esterilizados e água destilada
1159 deionizada, depois foi mantido em freezer a -20 °C, até o momento da utilização.

1160 Em seguida, os tubos contendo as seis alíquotas diluídas de sêmen foram
1161 colocadas em recipiente plástico com água a 34 °C até atingir a temperatura ambiente
1162 (25 °C), para, então, as alíquotas serem envasadas em palhetas de 0,25 mL (25x10⁶
1163 sptzs/palheta), previamente identificadas quanto aos tratamentos, sendo vedadas com
1164 álcool polivinílico.

1165 Para o resfriamento e congelamento do sêmen foi utilizado sistema programável
1166 de criopreservação de sêmen portátil (modelo TK-3000[®]) composto por um aparelho

1167 programável, equipado com um porta-palhetas de aço-inox, um tubo de resfriamento e
1168 uma caixa térmica para nitrogênio líquido.

1169 Para o resfriamento as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, o qual foi
1170 adicionado ao tubo de resfriamento, permanecendo até alcançar 5 °C. O aparelho foi
1171 programado para realizar o resfriamento a partir da temperatura ambiente e seguindo
1172 uma curva de resfriamento (P2S2) até 5 °C, com duração em torno de 120 min. Ao final
1173 de cada tempo de equilíbrio, o porta-palhetas foi removido para a caixa térmica
1174 contendo nitrogênio líquido (nível de 7 cm), na qual foi realizada a curva de
1175 congelamento (P2S2) com uma taxa de -20 °C/min de 5 °C até -120 °C.

1176 Após atingir esta temperatura (-120 °C), as palhetas foram removidas do porta-
1177 palhetas e imersas no nitrogênio líquido. Por fim, as palhetas foram colocadas em racks
1178 identificadas pelo nome do touro e tratamento e, então, armazenadas em botijões
1179 criogênicos contendo nitrogênio líquido (-196 °C), até o momento de realização das
1180 análises pós-descongelamento.

1181 5.6 Análise do sêmen pós-criopreservação

1182 Para cada análise realizada pós-descongelamento foram utilizadas duas palhetas
1183 de cada tratamento, buscando-se assim, retirar o efeito de palheta. As palhetas foram
1184 descongeladas em banho maria a 37 °C por 30 segundos. Após o descongelamento o
1185 sêmen foi colocado em um microtubo de 1,5 mL (tipo Eppendorf), homogeneizado e
1186 avaliados quanto aos parâmetros de motilidade e vigor visual (avaliados por
1187 microscopia óptica). Além disso, foram submetidos ao teste de termoresistência rápido,
1188 reação acrossomal e eosina-nigrosina.

1189 O TTR foi realizado por meio da manutenção de uma alíquota seminal mantida
1190 em banho maria a 45 °C por 30 minutos, sendo a motilidade espermática avaliada a cada
1191 10 minutos, a partir do momento 0.

1192 5.6.1 Análise da morfologia espermática

1193 Para a análise de morfologia espermática, alíquotas do sêmen pós-
1194 descongelamento, de cada tratamento, foram retiradas para análise posterior e
1195 adicionadas a 0,5 mL de solução formol-salina tamponada, previamente aquecida à 37
1196 °C, em seguida, refrigeradas até o momento da análise.

1197 Foi utilizada a técnica de preparações úmidas, com contagem de 200 células em
1198 aumento de 1.000x, sob microscopia de contraste diferencial interferencial (DIC). As

1199 porcentagens das diversas anormalidades morfológicas foram agrupadas e classificadas
1200 em defeitos maiores, menores e totais.

1201

1202 5.6.2 Análises da integridade das membranas plasmática e acrossomal, função
1203 mitocondrial e estresse oxidativo.

1204 As avaliações foram realizadas na Universidade de São Paulo, campus
1205 Pirassununga. Para esta análise foram colocados em microtubo 150 µL da amostra do
1206 sêmen diluído em meio TALP *sperm*, na concentração de 20×10^6 espermatozoides/mL,
1207 adicionados 3 µL de PI (0,5 mg/mL em DPBS), 6 µL de JC-1 (153 mM em DMSO) e
1208 50 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS). As amostras foram incubadas por 8
1209 minutos a 37 °C. Após a incubação uma gota (7 µL) desta foi utilizada para o preparo
1210 da câmara úmida, entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37 °C) e a leitura foi
1211 realizada sob microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência marca
1212 Nikon, Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420,) apresentando os
1213 conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação
1214 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-
1215 655 nm), com aumento de 1.000 x. As células foram classificadas em oito categorias de
1216 acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, conforme os descrito por Celeghini
1217 et al. (2008).

1218 As ROS foram avaliadas através da sonda fluorescente CellROX™ Reagente
1219 Deep Red. A partir da diluição do sêmen no meio TALP *sperm*, foi aliquotado 50 µL e
1220 acrescido 1 µL de H33342 e 2 µL de CellROX. A amostra foi incubada por 30 minutos a
1221 37 °C. Após a incubação foi centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm e uma gota (4 µL)
1222 desta foi utilizada para o preparo da câmara úmida, entre lâmina e lamínula (pré-
1223 aquecidas a 37 °C), sendo que a leitura foi realizada sob microscopia de
1224 epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência marca Nikon, Modelo Eclipse 80i)
1225 em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação
1226 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555
1227 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm), com aumento de 1.000 x.
1228 Após a leitura os espermatozoides foram classificados com e sem estresse oxidativo,
1229 conforme descrito por Alves et al. (2015).

1230

1231 5.7 Avaliação da fertilidade do sêmen: inseminação e taxa de concepção

1232 Após as análises laboratoriais do sêmen, foi realizada a inseminação com as
1233 amostras congeladas de cada tratamento. Os animais alocados no experimento passaram
1234 por avaliação do trato reprodutivo por meio de ultrassonografia (Chison D600Vet) para
1235 serem distribuídos dentro de cada tratamento. Animais que apresentaram alguma
1236 anomalia foram descartados.

1237 Foram utilizados 60 animais por tratamento, perfazendo um total de 240
1238 novilhas inseminadas, em tempo fixo (IATF), segundo o protocolo exposto abaixo
1239 (Figura 01).

1240

1241

1242

1243

1244

1245

1246

1247

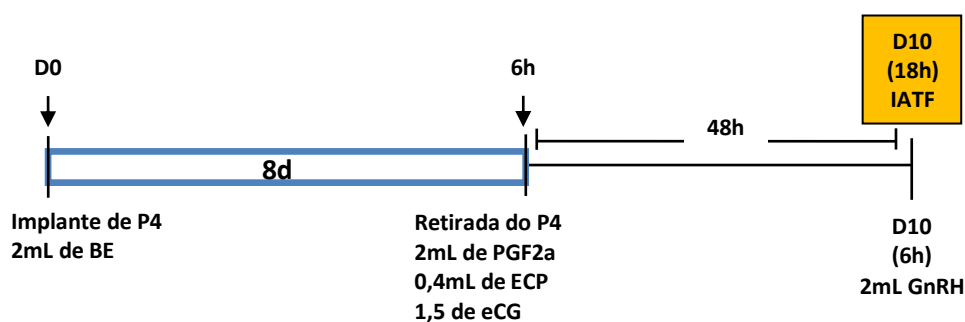
1248

1249

1250

1251

1252



1249 Figura 01: Protocolo para inseminação artificial em tempo fixo. P4: progesterona; BE: benzoato de estradiol; PGF2a:
1250 prostaglandina F2-alfa; ECP: cipionato de estradiol; eCG: gonadotropina coriônica equina; GnRH: hormônio
1251 liberador de gonadotropina.

1253 O diagnóstico de gestação foi realizado 45 dias após a insmeinação por meio de
1254 avaliação ultrassonográfica (Mindray DP 2200 vet).

1255 5.8 Análise Estatística

1256 O delineamento utilizado para análise do sêmen foi em blocos ao acaso, sendo
1257 cada touro um bloco. A variável TTRr enquadrou-se em blocos ao acaso com parcela
1258 subdividida. O delineamento para a determinação da taxa de fertilidade foi inteiramente
1259 casualizado, utilizando-se um pool das amostras por tratamento para as inseminações.
1260 Utilizou-se o programa BioEstat 5.0 para comparação das médias encontradas. As
1261 variáveis paramétricas foram avaliadas pela ANOVA, comparando-se as médias pelo
1262 teste de Tukey, e as variáveis não paramétricas pelo teste de Friedman, com
1263 significância de 5%. As respostas dicotômicas foram avaliadas por tabela de
1264 contingência, através do teste do Qui-quadrado. Todas as variáveis passaram pelos
1265 testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Lilliefors.

1266 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1267 6.1 Análises preliminares

1268 Os dados referentes ao exame imediato após a coleta do ejaculado dos animais
1269 alocados no experimento são apresentados na Tabela 01.

1270 Tabela 01. Parâmetros de motilidade, turbilhonamento, vigor, concentração e volume dos ejaculados de
1271 touros Nelore alocados no experimento analisados de forma subjetiva, São Luis, 2015.

Parâmetros	EJACULADOS											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Motilidade (%)	90	80	80	80	90	80	80	80	70	90	80	70
Turbilhonamento (escore 0-5)	3	3	3	2	3	2	3	3	2	3	3	3
Vigor (escore 1-5)	4	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Concentração ($\times 10^9$ spz/mL)	472	835	840	480	1280	740	1770	515	440	1135	500	600
Volume (mL)	8	8	9,5	8,5	8	9	7,5	9	9	7	8	12

1272 Os touros alocados no experimento se apresentaram dentro dos padrões e
1273 critérios pré-estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Henry e
1274 Neves, 1998). Conforme Pacheco et al. (2007), em estudo comparativo entre o
1275 perímetro escrotal, as características seminais e a idade, observaram que animais com a
1276 idade média de 30 meses apresentaram características espermiáticas, semelhante aos aqui
1277 expostos, o que demonstrou variação entre a qualidade espermiática dos diferentes
1278 touros, resposta esta, oriunda da individualidade dos mesmos.

1279 6.2 Análises após a criopreservação

1280 a. Motilidade e Vigor espermiático

1281 Após a criopreservação, quando avaliou-se a motilidade e o vigor de forma
1282 subjetiva, observou-se que não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos
1283 (Tabela 02).

1284 Tabela 02: Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) da motilidade e vigor em diferentes tratamentos do sêmen
1285 criopreservado de touros Nelore, São Luís, 2015.

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

1286 Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) pelo teste de Friedman.

1287 Quando se observa o efeito da GSH na motilidade e vigor espermático, a mesma
1288 não apresentou diferença frente aos demais tratamentos. Esses valores são semelhantes
1289 aos encontrados por Silva et al. (2012) que ao trabalharem com a concentração de 5 mM
1290 de GSH no diluidor para caprinos à base de leite, observaram que a adição não interferiu
1291 na motilidade dos espermatozoides submetidos ao processo de criopreservação. Assim
1292 como os encontrados por Tuncer et al. (2010), que ao realizarem avaliações no sêmen
1293 de bovinos com GSH nas concentrações de 0,5 e 2,0 mM, observaram que não
1294 interferiram na morfologia pós-criopreservação, bem como na motilidade espermática
1295 quando comparado com o grupo controle.

1296 Porém, vão de encontro aos encontrados por Soares et al. (2009) que ao
1297 adicionar 2 mM de GSH ao sêmen de caprinos observaram melhora na resposta da
1298 viabilidade espermática.

1299 Sariozkan et al. (2009), também encontraram melhora na motilidade espermática
1300 quando adicionaram 2 mM de GSH ao sêmen de bovinos da raça Holandesa e
1301 compararam ao grupo que tinha BSA. Assim como, aos encontrados por Oliveira et al.
1302 (2011), que ao adicionarem 2,5 mM de GSH ao sêmen de equinos, observaram um
1303 aumento da motilidade quando comparado com as concentrações de 5 mM, 7,5 mM e
1304 10 mM. Essa variação de resultados pode estar relacionada aos tipos de diluidores
1305 usados e a concentração do antioxidante.

1306 O tratamento com IGF-1 na concentração de 100 ng/mL não apresentou
1307 diferença significativa ($p>0,05$) quando comparado com os demais tratamentos,
1308 diferente do que se esperava, uma vez que o IGF-1 é um fator de crescimento que está
1309 associado ao aumento na motilidade espermática. Pois, apesar dessa concentração estar
1310 de acordo com as condições fisiológicas apontadas por Henricks et al. (1998), que
1311 obtiveram uma média de 116,29 ng/mL de IGF-1 de IGF-1 no plasma seminal de
1312 bovinos, estes autores concluíram que ocorre uma grande variação na concentração
1313 desse fator de crescimento, podendo variar de acordo com o animal, alimentação e
1314 ejaculado. Contudo, citando que este hormônio está relacionado com o estímulo da
1315 motilidade espermática.

1316 A resposta do presente estudo vai de encontro aos valores encontrados por
1317 Selvaraju et al. (2009), que ao avaliarem o efeito da adição de 100 ng/mL de IGF-1 ao
1318 sêmen de bubalinos, observaram aumento da velocidade retilínea e da motilidade
1319 espermática. Assim como os resultados encontrados por Souza (2011), que obteve
1320 correlação positiva entre as concentrações de IGF-1 do plasma seminal de touros Gir-

1321 Leiteiros e a motilidade espermática. O mesmo foi encontrado por Padilha et al. (2012)
1322 que ao avaliarem o efeito do fator de crescimento ao sêmen de ovinos, observaram que a
1323 concentração de 100 ng/mL, apresentaram valores de motilidade e viabilidade
1324 espermática superiores ao controle.

1325 Esses dados demonstram que a quantidade de IGF-1 presente no diluidor usado
1326 na criopreservação não aumentou a motilidade espermática, podendo ser justificada pela
1327 sua ação ser semelhante à da insulina, possuindo a função de capturar os nutrientes
1328 presentes no diluidor, aminoácidos e açúcares, facilitando, assim, a passagem para a
1329 região interna das células. Com esse aumento de nutrientes no meio intracelular
1330 promovido pelo IGF-1, pode tornar o aproveitamento da energia de uma forma mais
1331 rápida, favorecendo a liberação de grande quantidade de radicais livres, resultando na
1332 morte celular (Silva, 2010). Isso justifica o fato de não ter aumentado a motilidade
1333 espermática após a criopreservação e ter sido encontrada grande quantidade de células
1334 com elevado estresse oxidativo.

1335 Apesar das afirmações de Henricks et al. (1998) informarem que em bovinos
1336 existe em média 1000 receptores para IGF-1 nas células espermáticas, outro ponto a ser
1337 considerado é que, se a quantidade dos receptores para esse hormônio, presentes na
1338 membrana da célula espermática dos bovinos alocados no experimento, foi
1339 numericamente pequeno, isso pode justificar a ausência de efeitos influenciada pela
1340 adição de IGF-1 na motilidade e/ou viabilidade espermática. Assim, segundo Vickers et
1341 al. (1999), se a concentração de receptores nos espermatozoides não for equivalente à
1342 quantidade de IGF-1 presente no plasma seminal ou diluidor, não vai ocorrer nenhuma
1343 melhoria na motilidade espermática.

1344 b. Morfologia espermática

1345 Quanto às características morfológicas espermáticas, os percentuais de defeitos
1346 maiores e menores após a criopreservação foram superiores em todos os tratamentos
1347 quando comparados aos da avaliação do sêmen fresco. Porém, quando comparados
1348 entre os tratamentos não foi observada diferença significativa (Tabela 03).

1349

1350

1351

1352

1353 Tabela 03: Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) dos defeitos maiores e menores em diferentes tratamentos do
1354 sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.

Defeitos	<i>Controle</i>	<i>GSH</i>	<i>IGF-1</i>	<i>GSH+IGF-1</i>
Maiores (%)	$7,29 \pm 1,81$	$6,15 \pm 1,87$	$6,75 \pm 1,98$	$6,83 \pm 1,51$
Menores (%)	$3,45 \pm 1,68$	$2,95 \pm 0,75$	$3,0 \pm 0,97$	$2,87 \pm 0,52$
Defeitos totais (%)	$10,74 \pm 2,75$	$9,1 \pm 2,26$	$9,75 \pm 2,65$	$9,7 \pm 2,80$

1355 Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) pelo teste de Friedman.

1356 Os defeitos maiores e menores encontrados no sêmen a fresco foram de
1357 $5,5 \pm 1,16\%$ e $3,25 \pm 1,28\%$, respectivamente. Quando comparados com os defeitos
1358 apresentados após a criopreservação, sendo os defeitos maiores de $7,29 \pm 1,81$ e
1359 menores de $3,45 \pm 1,68$ no grupo controle. Contudo, não se obteve diferença
1360 significativa entre as avaliações de antes e após a congelamento seminal.

1361 Apesar de ser um procedimento rotineiro nas centrais de congelamento de sêmen
1362 e na indústria da inseminação artificial, a criopreservação ainda é uma técnica que
1363 promove grande quantidade de estresse celular, induzindo modificações na morfologia
1364 dos espermatozoides, os quais causam uma redução da motilidade e viabilidade
1365 espermática, impondo condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua
1366 viabilidade (Purdy, 2006; Bucak et al., 2010a).

1367 Nichi et al. (2007), demonstraram que espermatozoides bovinos com gota
1368 citoplasmática proximal apresentam uma maior produção de ROS, sendo mais
1369 susceptível ao estresse oxidativo do que os com gotas citoplasmáticas distais.

1370 Quando se avalia o uso da GSH no diluidor e o fato de não ter diferença quando
1371 comparado com os demais tratamentos, observa-se que esse antioxidante possui a
1372 finalidade de diminuir as injúrias que as ROS podem provocar nos espermatozoides,
1373 sendo que uma das consequências do aumento no estresse oxidativo é a elevada
1374 quantidade de defeitos espermáticos. Assim, a GSH preservou a morfologia
1375 espermática. Ansari et al. (2011), também observaram que o uso do antioxidante no
1376 sêmen de búfalos conseguiu manter a morfologia espermática sob controle, assim como
1377 a motilidade e viabilidade espermática.

1378 Já para a adição do IGF-1 ao sêmen, há relatos que esse hormônio promove uma
1379 melhora na qualidade espermática de equinos (MacPherson et al., 2002), búfalos
1380 (Selvaraju et al., 2009) e suínos (Silva et al., 2011). Nestes casos, a morfologia
1381 espermática é preservada, sugerindo assim que o IGF-1 possui função crucial na função
1382 espermática dessas espécies. Fato este corroborado pelos achados de Souza (2001), que

1383 encontrou correlação entre as concentrações seminais de IGF-1 e os defeitos totais
1384 durante a peripuberdade em touros Gir.

1385 c. Teste de termorresistência rápido

1386 Após a descongelação, as células espermáticas criopreservadas em Tris-Gema,
1387 dentro de cada tratamento (T1: controle, T2: GSH, T3: IGF-1 e T4: GSH+IGF-1),
1388 quando avaliadas entre si, não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$) quanto ao
1389 teste de termorresistência rápido (Tabela 04).

1390 Tabela 04: Média e desvio padrão ($X\pm S.D.$) da motilidade no momento 0', 10', 20' e 30' do TTRr em
1391 diferentes tratamentos do sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.
1392

Momento TTRr	<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

1393 Não houve diferença entre os tratamentos ($P>0,05$) pelo teste de Friedman.

1394

1395 Esses dados se assemelham aos encontros por Peixoto et al. (2013) que ao
1396 trabalharem com sêmen de cães, observaram que o diluidor com GSH e Trolox não
1397 interferiu na motilidade quando comparado com o controle durante o teste de TTR lento
1398 por 60 minutos.

1399 No entanto, quando se avaliou a manutenção da viabilidade espermática dentro
1400 dos tratamentos, compararam-se os tempos iniciais e finais do TTR, observando-se que
1401 o grupo controle, IGF-1 e associação tiveram diferença significativa ($P<0,05$) dentro do
1402 tempo, tendo uma diminuição da motilidade. Esses valores condizem com os
1403 encontrados por Pursel et al. (1972) que observaram que no decorrer do tempo de
1404 incubação ocorre diminuição da porcentagem de espermatozoides móveis em bovinos.

1405 Porém, ao avaliar a glutathiona, constatou-se que houve homogeneidade da
1406 motilidade dentro do período analisado, tendendo a preservar a motilidade por mais
1407 tempo, não tendo diferença entre o momento inicial e final ($P>0,05$) (Tabela 05).

1408

1409 Tabela 05: Tabela 04: Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) da motilidade em dois momentos 0' e 30' do
 1410 TTRr em diferentes tratamentos do sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.

Momento TTRr	<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

1411 Letras diferentes na mesma coluna diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Friedman.

1412 Esses dados se assemelham aos encontrados por Bilodeau et al. (2001), que ao
 1413 avaliar o sêmen criopreservado de bovinos acrescidos com 0,5 mM de GSH e incubados
 1414 por seis horas a 38,5 °C, foi possível manter a motilidade dos espermatozoides quando
 1415 não teve uma fonte externa de estresse oxidativo (H_2O_2) adicionada ao diluidor. Tuncer
 1416 et al. (2010), ao realizarem avaliações com sêmen criopreservado de bovinos com
 1417 diluidores acrescidos de GSH (0,5 e 2,0 mM), observaram que a motilidade progressiva
 1418 não teve diferença quando comparado com o grupo controle.

1419 Um fato que pode estar associado ao efeito da glutathiona no diluidor à base de
 1420 gema de ovo é que apesar da gema de ovo possuir boas propriedades antioxidantes elas
 1421 podem ser destruídas durante o processo de preparação, manipulação e armazenamento
 1422 do extensor. Apesar da gema de ovo ser um constituinte que está na concentração de
 1423 20% do diluidor e por possuir lipoproteínas que tem propriedades antioxidantes. Elas
 1424 possuem poucos antioxidantes enzimáticos, sendo que os não enzimáticos são oxidados
 1425 e não regenerados (Yamamoto et al., 1994). Devido a isso, a adição da glutathiona foi
 1426 benéfica na manutenção da motilidade dentro do tempo estabelecido.

1427 d. Avaliação das membranas espermáticas

1428 Quanto aos percentuais de membrana plasmática e acrossomal intactas
 1429 demonstrados pela associação de sondas fluorescentes foi possível verificar que não
 1430 ocorreu diferença significativa entre os diferentes tratamentos (Tabela 06).

1431 Tabela 06: Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) de espermatozoides com membrana acrossomal e plasmáticas
 1432 intactas em diferentes tratamentos do sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.
 1433

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

1434 Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey. PI – membrana plasmática intacta; AI – acrossoma intacto;
 1435 PIAI – espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas.

1436 A integridade da membrana é essencial para comunicação entre células, onde a
1437 membrana intacta tem a função de regular o transporte de íons pela membrana através
1438 de diferentes receptores (Jeyendran et al., 1984; Van der Ven et al., 1986).

1439 Nota-se que a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra em
1440 todos os tratamentos foi baixa, assim como a de acrossoma intacto, porém essa resposta
1441 pode está associada a fluorescência das sondas utilizadas no diluidor TRIS. Quando se
1442 avalia os espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras é possível
1443 observar que uma pequena quantidade de espermatozoides estão aptos a realização da
1444 fecundação. Visto que, para a célula espermática ser capaz de realizar suas funções e
1445 chegar ao local da fecundação é necessário que as membranas espermáticas estejam
1446 íntegras.

1447 Assim, ficou constatado que a GSH e o IGF-1, nas concentrações usadas, não
1448 conseguiram melhorar a qualidade da membrana acrossomal e plasmática. Esses
1449 resultados podem indicar que a GSH por ser um antioxidante importante na manutenção
1450 das membranas celulares, pode impedir a formação de oxigênio livre e, assim, diminuir
1451 os radicais livres no meio intracelular. Desta forma, não possuiu efeito positivo, com
1452 relação a integridade das membranas, quando adicionado na concentração de 2 mM.

1453 Isso provavelmente se ocorreu devido a uma diminuição da concentração desse
1454 antioxidante durante o processo de criopreservação. Segundo Bilodeau et al. (2000),
1455 após a criopreservação do sêmen bovino ocorre uma diminuição de 78% da
1456 concentração de GSH. Além disso, tem sido demonstrado que dependendo da
1457 concentração do GSH ele pode causar danos aos espermatozoides bovinos, por alterar a
1458 osmolaridade celular, fragilizar a membrana plasmática e causar ruptura nessa estrutura
1459 (Bilodeua et al., 2001).

1460 O mesmo foi notado por Stradaioli et al. (2007), que observaram que nos
1461 diluidores para bovinos a base de gema de ovo ocorre uma diminuição na concentração
1462 de GSH quando comparado com os sem produtos de origem animal.

1463 Esses dados são semelhantes aos encontrados por Soares et al. (2011), que ao
1464 avaliarem as concentrações de 2 mM, 5 mM e 7 mM/mL de GSH no diluidor,
1465 constataram que as diferentes concentrações não conseguiram preservar a integridade
1466 da membrana dos espermatozoides de caprinos. O mesmo foi encontrado por Silva et al.
1467 (2012), ao trabalharem com 5 mM de GSH no diluidor à base de leite, observaram que a
1468 adição não interferiu na qualidade dos espermatozoides caprinos submetidos ao
1469 processo de criopreservação.

1470 Já Sariozkan et al. (2009), ao trabalharem com bovinos da raça Holandesa
1471 adicionaram ao diluidor 2 mM de GSH e após a criopreservação observaram uma
1472 manutenção na integridade das membranas espermáticas quando comparado com o
1473 grupo controle. Porém, ao avaliarem a taxa de gestação na concentração usada de GSH
1474 não obtiveram diferença significativa, comparada com o grupo controle.

1475 Quando se refere ao IGF-1, observou-se que não promoveu melhora na
1476 manutenção da integridade das membranas espermáticas. Esses dados são contrários aos
1477 encontrados por Brito et al (2007) que observaram uma correlação positiva entre a
1478 concentração de IGF-1 e a manutenção da integridade das membranas. Porém, Selvaraju
1479 et al. (2010) ao trabalharem com sêmen de búfalos e acrescentar 100 ng/mL de IGF-1 ao
1480 diluidor e testar a integridade do acrossoma em diferentes períodos de incubação,
1481 observaram que o hormônio não promoveu efeito na integridade do acrossoma dos
1482 espermatozoides quando foram comparados com o grupo controle, sendo que esse
1483 parâmetro pode ser útil para prever a capacidade fertilizante dos espermatozoides.
1484 Porém, citou que a funcionalidade da membrana plasmática foi mantida. Além disso,
1485 demonstraram a importância do papel antioxidante deste hormônio, pois ele promoveu
1486 uma redução da lipoperoxidação lipídica.

1487 Padilha et al. (2012) ao avaliarem diferentes concentrações de IGF-1 no sêmen
1488 de ovinos, observaram que as concentrações de 100 e 250 ng/mL não influenciaram na
1489 integridade acrossomal e da membrana plasmática dos espermatozoides ovinos quando
1490 comparados com o grupo controle, assim como, na taxa de gestação das ovelhas.

1491 e. Estresse oxidativo

1492 Quanto se analisou o estresse oxidativo com auxílio da sonda CellRox Deep
1493 Red, responsável por avaliar a quantidade de ROS, como hidróxido e peróxido de
1494 hidrogênio, presentes nas células espermáticas, com e sem estresse oxidativo, observou-
1495 se que o IGF-1 apresentou maior ($P>0,05$) quantidade de células com estresse oxidativo,
1496 quando comparado com os demais tratamentos (Tabela 07).

1497

1498

1499

1500 Tabela 07: Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) de espermatozoides com e sem estresse oxidativo em
 1501 diferentes tratamentos do sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.

Estresse Oxidativo	<i>Controle</i>	<i>GSH</i>	<i>IGF-1</i>	<i>GSH+IGF-1</i>
Sem (%)	85,46 ± 9,97 ^a	82,79 ± 19,84 ^a	63,63 ± 24,10 ^a	24,04 ± 20,26 ^a
Com (%)	14,54 ± 10,08 ^a	17,21 ± 19,21 ^a	36,38 ± 24,10 ^b	24,04 ± 20,26 ^a

1502 Letras distintas na mesma linha diferem pelo teste Exato de Fisher ($P < 0,05$)

1503

1504 Esses dados enfatizam os comentados por Severaju et al. (2009), onde
 1505 informaram que o IGF-1 é responsável por ser um ativador do metabolismo
 1506 espermático, está envolvido no aumento da motilidade espermática e, por consequência,
 1507 no aumento do metabolismo de hidratos de carbono.

1508 O'Flaherty et al. (1997) afirmaram que o aumento no metabolismo de energia
 1509 das células espermáticas está relacionado com a geração de maior quantidade de
 1510 radicais livres, podendo afetar a qualidade espermática e a sua capacidade fecundante.
 1511 Pois, as reações produzidas naturalmente no organismo através do próprio metabolismo
 1512 como os subprodutos oriundos da respiração e a síntese de estruturas mais complexas,
 1513 podem gerar as espécies reativas de oxigênio (ROS), cujos radicais livres mais
 1514 encontrados são: o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot) e o metabólito
 1515 peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Iwasaki; Gagnon, 1992; Chan et al., 1999; Borges et al.,
 1516 2011)

1517 Porém, Selveraju et al. (2009) afirmaram que quando o IGF-1 foi adicionado ao
 1518 sêmen de búfalos e submetidos ao teste do MDA, observaram correlação direta com a
 1519 redução dos níveis de peroxidação lipídica. Esses dados estão de acordo com as
 1520 afirmativas de Alvarez e Storey (1982), que informaram que a adição de IGF-1 pode
 1521 promover uma melhora na motilidade de espermatozoides após a criopreservação
 1522 devido a redução na peroxidação lipídica.

1523 O IGF-1, além de possuir funções relacionadas à motilidade também foi citado
 1524 possuir funções na capacitação espermática, sendo que em seres humanos com
 1525 diferentes quadros de infertilidade, o IGF-1 adicionado ao sêmen em programas de
 1526 fertilização *in vitro* auxiliou na capacitação espermática (Sanchez – Luengo et al.,
 1527 2005). Desta forma, uma vez que o receptor de IGF-I possui atividade de tirosina
 1528 quinase e seu ligante está presente no plasma seminal, o sistema IGF-I pode estar
 1529 envolvido no sinal de transdução, conduzindo ao aumento da motilidade, a capacitação
 1530 espermática e exocitose acrossômica (Gupta, 2005). Souza (2011) encontrou correlação

1531 entre as concentrações de IGF-1 no plasma seminal e as concentrações dos picos
1532 proteicos de proteínas com afinidade à heparina. O que corrobora a idéia da ligação
1533 desse hormônio com o processo de capacitação espermática.

1534 Assim, no momento em que se realizam os processos de capacitação
1535 espermática, hiperativação, reação acrossômica, alteração no metabolismo espermático
1536 e motilidade espermática ocorre produção de ROS que vão atuar também nesses
1537 processos (Soares e Guerra, 2009; Borges et al., 2011; Walczak-Jedrzejowska et al.
1538 2013). Desta forma, como o IGF-1 é um hormônio que estimula a hiperativação, a
1539 motilidade espermática e está envolvido na reação acrossômica, auxiliando no processo
1540 de ligação dos espermatozoides à zona pelúcida ele promove uma maior liberação de
1541 ROS nos espermatozoides causando o aparecimento do estresse oxidativo.

1542 Como a sonda utilizada avalia a quantidade de hidróxido e peróxido de
1543 hidrogênio presente na amostra (Alves et al., 2015). Esses radicais são os principais
1544 subprodutos do aumento do metabolismo espermático induzido pelo fator de
1545 crescimento.

1546 Ao analisar os dados do GSH, observa-se que 82,79% das células espermáticas
1547 não apresentaram estresse oxidativo, isso demonstra que apesar de não ter tido diferença
1548 significativa quando comparada com o controle, a GSH conseguiu manter as ROS sob
1549 controle.

1550 Gadea et al. (2005), ao trabalharem com GSH na concentração de 1 mM e 5
1551 mM, observaram que a adição exógena desse antioxidante só tem efeito quando os
1552 níveis de GSH endógenos estão abaixo dos níveis normais.

1553 Os dados encontrados por Soares et al. (2011) vão de encontro aos resultados
1554 obtidos aqui. Pois, estes autores, trabalhando com sêmen de caprinos criopreservados
1555 com diluidor a base de leite desnatado, demonstraram que a adição de 2mM de GSH
1556 provocou danos subletais aos espermatozoides devido a exposição espermática ao O_2^- ,
1557 resultando em aumento da produção de ROS. Assim, concluíram que a adição de GSH,
1558 nas concentrações usadas, não foi adequada para inativar ROS como O_2^- e OH^- .

1559 Ansari et al. (2011), trabalhando com sêmen de búfalos refrigerado a 5 °C,
1560 observaram que a adição de glutathiona na concentração de 0,5 e 1,0 mM foi possível
1561 manter os níveis de estresse, mantendo também a viabilidade espermática. Já Tuncer et
1562 al. (2010) observaram no sêmen bovino que os diluidores acrescidos de GSH (0,5 e
1563 2,0 mM), diferiram, significativamente, com relação ao estresse oxidativo quando
1564 comparado com o grupo controle.

1565

f. Taxa de Gestação

1566

1567

1568

1569

1570

1571

Tabela 08: Porcentagem de novilhas Nelores gestantes e não gestantes após a inseminação com diferentes tratamentos do sêmen criopreservado de touros Nelore, São Luis, 2015.

Diagnóstico de gestação	<i>Controle</i>	<i>GSH</i>	<i>IGF-1</i>	<i>GSH+IGF-1</i>
Gestante (%)	38,33	33,0	36,66	38,33
Não Gestante (%)	61,66	67,0	63,34	61,66

1572

1573

1574

1575

1576

1577

1578

1579

1580

1581

Esses dados são contrários aos obtidos por Sinha et al. (1996), que adicionaram ao sêmen de caprinos as concentrações de 2 e 5 mM 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 trabalharem com sêmen de búfalos com 0,75 mM de GSH na FIV, encontraram uma média de 13,67% (GSH) de blastocistos comparado com 9,74% (Controle), possuindo diferença significativa. Esses autores concluíram que a adição da GSH promoveu uma melhora na qualidade de desenvolvimento embrionário quando comparado com os demais grupos. Além de melhorar a qualidade espermática.

1582

1583

1584

1585

1586

Porém, os dados são semelhantes aos observados por Sariozkan et al. (2009) que ao avaliarem a concentração 2 mM 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 não foi incrementada ($P>0,05$) com a adição de GSH, quando comparado com grupo controle.

1587

1588

1589

1590

1591

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

1592

1593

1594

Quanto a adição de GSH ao diluidor para a criopreservação do sêmen era esperada 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

1595 manter a motilidade espermática (Foote et al., 2002; Funahashi Sano, 2005) e a proteger
1596 contra danos oxidativos (Alvarez e Storey, 1989). Porém, no presente estudo apesar da
1597 GSH ter mantido a motilidade e ter preservado 82% das células espermáticas contra o
1598 estresse oxidativo, não foi possível obter diferença significativa entre as taxas de
1599 gestações, pois existem outros fatores que podem ter influenciado no momento da
1600 fecundação.

1601 Com relação ao IGF-1, Henricks et al. (1998) afirmaram que o IGF-1 presente
1602 no plasma seminal bovino pode interagir com uma determinada região acrossomal do
1603 espermatozoide, onde possui receptores de IGF-1. Essa interação pode aumentar a
1604 motilidade espermática e o vigor. Assim, a presença do fator de crescimento no trato
1605 reprodutivo masculino e feminino, bem como de seus receptores sugere um possível
1606 papel na regulação em eventos de pré-implantação.

1607 Segundo Quetglas et al. (2001), a adição de IGF-1 na maturação *in vitro* ou
1608 cultura dos embriões não teve efeito benéfico no desenvolvimento de embriões bovinos.
1609 Esses dados estão de acordo com os encontrados por Padilha et al. (2012) que avaliaram
1610 diferentes concentrações de IGF-1 e observaram que os tratamentos com 100 e
1611 250 ng/mL de IGF-1 foram superiores ao controle com relação as características
1612 seminais após uma hora do descongelamento. Porém, não teve diferença na taxa de
1613 gestação dos animais quando comparado com o grupo controle.

1614 Assim, mais estudos são necessários para entender o mecanismo pelo qual o
1615 IGF-1 sofre para prever seu efeito sobre a fertilidade.

1616 **7. CONCLUSÃO**

1617 Com base nos dados obtidos, conclui-se que:

- 1618 a. O IGF-1 e a sua associação com a glutathione reduzida não causaram
1619 mudanças na motilidade espermática, na integridade da membrana
1620 plasmática e acrossomal;
- 1621 b. O IGF-1 promoveu aumento do estresse oxidativo;
- 1622 c. A GSH não causou mudanças na integridade da membrana plasmática e
1623 acrossomal, mas favoreceu na manutenção da motilidade espermática
1624 durante o tempo de avaliação;
- 1625 d. O IGF-1, a GSH e associação não promoveram diferenças na taxa de
1626 gestação.

1627

1628 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

1629

1630 Agarwal, A.; Nallella, K.P.; Allamaneni, S.S.; Said, T.M. Role of antioxidants in
1631 treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reproduction Biomed**
1632 **Online**, v.8, p: 616, 2004.

1633 Agrawal, A.; Prabakaram, S.A. Oxidative stress and antioxidants in male infertility: a
1634 difficult balance. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**. Vol.3. No.1 p: 1-8,
1635 2005.

1636 Ahima, R.S.; Saper, C.B.; Flier, J.S. Leptin regulation of neuroendocrine systems.
1637 **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.21, n.3, p. 263-307, 2000.

1638 Ahn, H.Y.; Fairfull-Smith, K.E.; Morrow, B.J.; Lussini, V.; Kim, B.; Bondar, M.V.;
1639 Bottle, S.E.; Belfield, K.D. Two-photon fluorescence microscopy imaging of cellular
1640 oxidative stress using profluorescent nitroxides. **Journal of the American Chemical**
1641 **Society**, v.134, p. 4721-4730, 2012.

1642

1643 Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis. **Journal**
1644 **Reproduction Fertility**.v.115, p. 1–7, 1999.

1645 Aitken. R.J.; Jones, K.T. and Robertson, S.A. Reactive Oxygen Species and Review
1646 Sperm Function—In Sickness and In Health. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 6, 2012.

1647 Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M. Redox regulation of
1648 tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human
1649 sperm function. **Journal Cell Science**, v.108, p.2017–2025, 1995.

1650 Aitken R.J.; Ryan A.L.; Curry B.J.; Baker M.A. Multiple forms of redox activity in
1651 populations of human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.9, p.645-661,
1652 2003.

1653 Aitken, R.J.; Curry, B.J. Redox regulation of human sperm function: from the
1654 physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA
1655 damage in the germ line. **Antioxid Redox Signal**, v.14, p.367–381, 2011.

1656

1657 Aitken, R.J.; Smith, T.B.; Lord, T.; Kuczera, L.; Koppers, A.J.; Naumovski, N.;
1658 Connaughton, H.; Baker, M.A.; De Luliis, G.N. On methods for the detection of
1659 reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular
1660 responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acido.
1661 **Andrology**, v.1, p. 192-205, 2013.

1662

1663 Aisen, E.G. Reprodução ovina e caprina. **Ed. São Paulo: Medicina Veterinária** v.1, p:
1664 203, 2008.

1665 Alves, M.B.R.; Andrade, A.F.C.; Arruda, R.P.; Batissaco, L.; Florez-Rodriguez, S.A.;
1666 Lançoni, R.; Oliveira, B.M.M.; Torres, M.A.; Ravagnani, G.M.; Almeida, T.G.;
1667 Vellone, V.S.; Celeghini, E.C.C. An Efficient Technique to Detect Sperm Reactive

1668 Oxygen Species: The CellRox Deep Red[®] Fluorescent Probe. **Biochemistry &**
1669 **Physiology**,v.4, p. 1-5, 2015.

- 1670 Alvarez, J.G.; Storey, B.T. Role of glutathione peroxidase in protectin mammalian
1671 spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete**
1672 **Research**, v.23, p.77 - 90, 1989.
1673
- 1674 Amann R.P.; Pickett B.W. Principle of cryopreservation and a review of stallion
1675 spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-174, 1987.
- 1676 Ansari M.S., Rakha B.A., Ullah N., Andrabi S.H.M., Khalid M. & Akhter S. Effect of
1677 L-Cysteine in Tris-citric Egg Yolk Extender on Post-Thaw Quality of Nili-Ravi Buffalo
1678 (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. **Pakistan Journal Zoological**, 43:41-47, 2011.
- 1679 Ansari, M.S.; Rakha, B.A.; Iqbal, R.; Akhter, S.; Effect of Glutathione in Extender on
1680 the Freezability of Sahiwal Bull Spermatozoa **Pakistan Journal. Zoological.**, v. 46(1),
1681 p. 17-21, 2014.
- 1682 Aziz N.; Saleh R.A.; Sharma R.K.; Novel association between sperm reactive oxygen
1683 species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index.
1684 **Fertility Steril**, v. 81, p. 349–354, 2004.
- 1685 Bansal, A.K.; Bilaspuri, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen
1686 functions. **Veterinary Medicine International**, 2011.
- 1687 Barreto, S.C.S.; Zapata, J.F.F.; Freitas, E.R.; Fuentes, M.F.F.; Nascimento, R.F.;
1688 Araújo, S.R.S.M.; Amorim, A.G.N. Ácidos graxos da gema e composição do ovo de
1689 poedeiras alimentadas com rações com farelo de coco. **Pesquisa Agropecuaria**
1690 **Brasileira**, v.41, p.1767-1773, 2006.
- 1691 Bartke, A. Delayed aging in Ames dwarf mice. Relationships to endocrine function and
1692 body size. **The Molecular Genetics of Aging**, p. 181–202, 2000.
1693
- 1694 Baumber J, Vo A, Sabeur K, Ball BA. Generation of reactive oxygen species by equine
1695 neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57,
1696 p.1025-1033, 2002.
- 1697 Beconi, M. T.; Francia, C. R.; Mora, N. G. Effects of natural antioxidants on frozen
1698 bovine semen preservation. **Theriogenology**. V. 40, p. 841-851, 1993.
- 1699 Bergeron, A.; Crête, M.H.; Brindle, Y.; Manjunath, P. Lowdensity lipoprotein fraction
1700 from hen's egg yolk decreases the binding of the major bovine seminal plasma to sperm
1701 and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biologic Reproduction**, v.70,
1702 p.08-17, 2004.
- 1703 Bergeron, A.; Brindle, Y.; Blondin, P.; Manjunath, P. Milk caseins decrease the binding
1704 of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the
1705 sperm membrane during sperm storage. **Biologic Reproduction**, v.77, p.120-126, 2007.
- 1706 Beorlegui, N.; Cetica, P.; Trinchero, G.; Córdoba, M.; Beconi, M. Comparative study of
1707 functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. **Andrology**, v.29, p.37-
1708 42, 1997.
- 1709 Borges, J.C.; Silva, M.R.; Guimarães, J.D.; Esper, C.R.; Franceschini, P.H. Membrana
1710 plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólicos do oxigênio,

- 1711 antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.3,
1712 p: 303-314, 2011.
- 1713 Bilodeau, J.F.; Chatterjee, S.; Sirard, M.A.; Gagnon, C. Levels of antioxidant defenses
1714 are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular**
1715 **Reproduction and Development**, v.55, p:282-288, 2000.
- 1716 Bilodeau, J.F.; Blanchette, S.; Gagnon, C.; Sirard, M.A. Thiols prevent H₂O₂ mediated
1717 loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v.56, p. 275-286,
1718 2001.
- 1719 Brito, L.F.C.; Barth, A.D.; Rawlings, N.C.; Wilde, R.E.; Crews, D.H.; Mir, P.S.;
1720 Kastelic, J.P. Effect of nutrition during calthood and peripubertal period on serum
1721 metabolic hormones, gonadotropins and testosterone concentrations, and on sexual
1722 development in bulls. **Domestic Animal Endocrinology**, v.33, p. 1-18, 2007.
- 1723 Bucak, M.N.; Ates, S.; Ahin, A.; Yuce, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress
1724 parameters on ramsemen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant**, v. 75, p.
1725 128–134, 2008.
- 1726 Bucak, M.N.; Sariozkan, S.; Tuncer, P.B.; Sakin, F.; Atessahin, A.; Kulaksiz, R.; Cevik,
1727 M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*)
1728 sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant**, v. 89,
1729 p. 24–30, 2010a.
- 1730 Bucak, M.N.; Tuncer, P.B.; Sariözkan, S.; Baspinar, N.; Taspinar, M.; Kenan, C.;
1731 Bilgili, A.; Akalin, P.P.; Buyukleblebici, S.; Aydos, S.; Ilgaz, S.; Sunguroglu, A.;
1732 Oztuna, D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress
1733 parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v.
1734 61, p. 248–253, 2010b.
- 1735 Câmara, D.R.; Silva, S.V.; Medeiros, L.R.D. Efeito da adição de antioxidantes ao meio
1736 diluidor na qualidade do sêmen ovino pós-descongelação. In: **SINCORTE** – Simpósio
1737 Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 4, , João Pessoa – PB, 2009.
- 1738 Castelo, T.S.; Frota, T.R.; Silva, A.R.. Considerações sobre a criopreservação do sêmen
1739 de caprinos. **Acta Veterinária Brasileira**, v.2, p.67-75, 2008.
- 1740 CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2^a Ed. Belo
1741 Horizonte, **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 49p., 1998.
- 1742 Celeghini, E.C.C.; Arruda, R.P.; Andrade, A.F.C.; Nascimento, J.; Raphael, C.F.;
1743 Rodrigues, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopresrvation using two different
1744 extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**,
1745 v.104, p.119-131, 2008.
- 1746 Celeghini, E.C.C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas
1747 plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides
1748 utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186f. **Tese (Doutorado em Medicina**
1749 **Veterinária e Reprodução Animal)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
1750 da Universidade de São Paulo, São Paulo.

- 1751 Chan, A.C.; Chow, C.K.; Chiu, D. Interaction of Antioxidants and Their Implication in
1752 Genetic Anemia. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 222, n.3, p.274-
1753 282, 1999.
- 1754 Chaveiro, A.; Liu, J.; Engel, B. Significant variability among bulls in the sperm
1755 membrane permeability for water and glycerol: Possible implications for semen freezing
1756 protocols for individual males. **Cryobiology**, v. 53, n. 3, p. 349-359, 2006
- 1757 Christophersen, B.O. The inhibitory effect of reduced glutathione on the lipid
1758 peroxidation of microsomal fraction and mitochondria. **Biochemical Journal**, v. 106, p.
1759 515-522, 1968.
- 1760 Çoian, K.; Baspınar, N.; Bucak, M.N.; Akalin, P.P.; Ataman, M.B.; Ömür, A.D.;
1761 Güngör, S.; Kürükünay, S.; Özkalp, B.; Sariözkan, S. Influence of methionine and
1762 dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during
1763 liquid storage of ram semen. **Research in Veterinary Science**, 2010.
- 1764 Cottorello, A.C.P. Criopreservação de sêmen equino utilizando associação de
1765 etilenoglicol e glicerol. 2002. 47f. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) –
1766 Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 1767 Cottorello, A.C.P.; Henry, M. Princípios da criopreservação, congelamento e avaliação do
1768 sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n.1, p. 14-25, 2002.
- 1769 De Lamirande E and Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I.
1770 Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of**
1771 **Andrology**. v.13; p. 368–378, 1992.
- 1772 De Lamirande, E.; Gagnon, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts
1773 of an oxidative process. **Free Radical Biological Medicine**, v.14, p.255-265, 1993.
- 1774 De Lamirande, E.; Lamonthe, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation
1775 during human sperm capacitation. **Free Radical Biological Medicine**, v.46, p.502-510,
1776 2009.
- 1777 De Lamirande, E.; O' Flahert, C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and
1778 kinases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 106-115, 2008.
- 1779 Denvireddy, R.V.; Swalund, D.J.; Olin, T.; Vincent, W.; Troedson, M.H.T.; Bischof,
1780 J.C.; Roberts, K.P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the
1781 presence and absence of cryoprotective agents determined used differential scanning
1782 calorimetry. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 222-231, 2002.
- 1783 Evenson, D.P.; Darzynkiewicz, Z.; Melamed, M.R. Simultaneous measurement by flow
1784 cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell
1785 motility. **Journal Histochem Cytochem**, v. 30, p. 279-280, 1982.
- 1786 Farstard, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction**
1787 **Science**, v. 42, p. 251-260, 1996.
- 1788 Farstad, W. Cryopreservation of canine semen – new challenges. **Reproduction in**
1789 **domestic animals**, v. 44, p: 336-341, 2009.

- 1790 Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas,
1791 sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Assistência Médica Brasileira**, v.43,
1792 n.1, p.61-68, 1997.
- 1793 Fisher, H.M. and Aitken, R.J. Comparative analysis of the ability of precursor germ
1794 cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. **Journal of**
1795 **Experimental Zoology**, v.277, p. 390–400, 1997.
- 1796 Foote, R.H.; Brockett, C.C.; Kaproth, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole
1797 milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.13-23,
1798 2002.
- 1799 Funahashi, H.; Sano, T. Select antioxidants improve the function of extended boar 368
1800 semen stored at 10°C. **Theriogenology**, v. 63, p.1605–1616, 2005.
- 1801 Gadea, J.; Sellés, E.; Marco, M.A.; Coy, P.; Matás, C.; Romar, R. Decrease in
1802 glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of
1803 reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, v.62, p.
1804 690 – 701, 2004.
- 1805 Gadea, J.; Garcia-Vazquez, F.; Matas, C.; Gardon, J.C.; Canovas, S.; Gumbao, D.
1806 Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with
1807 reduced glutathione preserves sperm function. **Journal of Andrology**, v. 26, p. 396-404,
1808 2005.
- 1809
- 1810 Garrido, N.; Meseguer, M.; Simon, C.; Pellicer, A.; Remohi, J. Prooxidative and
1811 antioxidative imbalance in human semen and its relation with male infertility. **Asian**
1812 **Journal Andrology**, v. 6, p.59-65, 2004.
- 1813
- 1814 Gelber SJ, Hardy MP, Mendis-Handagama SMLC, Casells SJ. Effects of insulin-like
1815 growth factor-I on androgen production by highly purified pubertal and adult rat Leydig
1816 cells. **Journal of Andrology**, v.13, p.125–30, 1992.
- 1817 Gnessi, L.; Fabbri, A.; Spera, G. Gonadal Peptides as Mediators of Development and
1818 Functional Control of the Testis: An Integrated System with Hormones and Local
1819 Environment. **Endocrine Reviews**. v.18, n.4, p.541-609, 1997.
- 1820 Gomez, E.; Buckingham, D.W.; Brindle, J.; Lanzafame, F.; Irvine, D.S. and Aitken, R.J.
1821 Development of an image analysis system to monitor the retention of residual
1822 cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the
1823 cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. **Journal of Andrology**, v.17,
1824 p. 276–287, 1996.
- 1825 Gonçalves, F.S.; Barreto, L.S.S.; Arruda, R.P.; Perri, S.H.V.; Mingoti, G.Z. Effect of
1826 antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo
1827 development. **Reproduction Domestic Animal**, v.45, p.129–135, 2010.
- 1828 Gonzalez, R. A. F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e
1829 crioprotetores sobre os parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do
1830 espermatozoide bovino. 93f. **Dissertação** (Mestrado), Pirassununga/SP, 2004.

- 1831 Graham, J.K. Response of spermatozoa to freezing. In: Techniques for handling and
1832 utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. **Fort Collins.**
1833 **Proceedings...** Fort Collins: Colorado State University, p. 83-95, 1995.
- 1834 Graham, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Reproduction and**
1835 **Technology.** v. 12, n. 1, p. 131-145, 1996.
- 1836 Grinberg, Y. ROS production measurement using con-focal microscopy? 2013.
- 1837 Gupta, G. S. Non-Steroidal Signal Molecules in Spermatogenesis. **Proteomics of**
1838 **Spermatogenesis,** p. 47-76, 2005.
- 1839 Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New
1840 York: **Oxford University Press,** p.: 936, 1999.
- 1841 Henkel R and Schill WB. Sperm separation in patients with urogenital infections.
1842 **Andrology,** v. 30 Suppl 1: 91–97, 1998.
- 1843 Henricks, D.M.; Kouba, A.J.; Lackey, B.R.; Boone, W.R.; Gray, S.L. Identification of
1844 insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa:
1845 influence on sperm motility, **Biological. Reproduction,** v.59, p. 330–337, 1998.
- 1846 Henry, M.; Neves, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen**
1847 **animal.** 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 49p, 1998.
- 1848 Hirai, M.; Boersma, A.; Hoeflich, A. Objectively measured sperm motility and sperm
1849 head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth
1850 factors, **Journal of Andrology,** v. 22, p. 104–110, 2001.
- 1851 Hiwasa, M.; Kohno, H.; Togari, T.; Okabe, K.; Fukui, Y. Fertility after different
1852 artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. **Journal of**
1853 **Reproduction and Development,** v.55, p.50-54, 2009.
- 1854 Hogarth, C.A. and Griswold, M.D. The key role of vitamin A in spermatogenesis.
1855 **Journal Clinical Invest,** v. 120; p. 956–962, 2010.
- 1856 Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science,**
1857 v. 1/3, p. 3-22, 2000.
- 1858 IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil 2009.** Rio de Janeiro, v.56, 2009.
- 1859 Iwasaki, A.; Gagnon, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of
1860 infertile patients. **Fertility and Sterility,** v. 57, p. 2409-2416, 1992.
- 1861 Janero, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices
1862 of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine,**
1863 v. 9, n. 6, p. 515–540, não achei mês.1990.
- 1864 Jeyendran, R.S.; Van Der Ven, H.H.; Perez-Pelaez, M.; Crabo, B.G.; Zaneveld, L.J.D.
1865 Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm
1866 membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction**
1867 **Fertility,** v.70, p.219-228, 1984.

- 1868 Jones, R, M. T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa.
1869 **Journal Reproduction Fertility**, v. 50, p. 255-260, 1977.
- 1870 Kraus, M.; Tichá, M.; Zelezná, B. Characterization of human seminal plasma proteins
1871 homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**,
1872 v.65, n.1, p.33-46, 2005.
- 1873 Krzyzosiak, J.; Molan, P.; McGowan, L.; Vishwanath, R. Effect of sperm number and
1874 oxygenation state of the storage media on in vitro fertility of bovine sperm stored at
1875 ambient temperature. **Theriogenology**, v.55, p.1401-1415, 2001.
- 1876 Kumar, S.; Millar, J.D.; Watson, P.F. The effect of cooling rate on the survival of
1877 cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate
1878 cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p.246-253, 2003.
- 1879 Lapenna, D.; Ciofani, G.; Pierdomenico, S.D.; Giamberardino, M.A.; Cuccurullo, F.
1880 Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity
1881 and lipid preoxides in human plasma. **Free Radical Biological Medicine**, v.31, p.331-
1882 335, 2001.
- 1883 Lejeune, H.; Chuzel, F.; Thomas, T. Paracrine regulation of Leydig cells, **Annales**
1884 **Endocrinologie**, v. 57, p. 55–63, 1996.
- 1885 Leite, P.A.; Schreder, G.G.; Almeida, C.L.R.; Zúccari, C.E.S.N.; Silva, E.V.C.
1886 Criopreservação do sêmen bovino. UNOPAR **Científica Ciências Biológicas e da**
1887 **Saúde**, v. 13, p.279-86, 2011.
- 1888 Lenzi, A.; Picardo, M.; Gandini, L.; Lombardzo, F.; Terminali, O.; Passi, S.; Dondero,
1889 F. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. **Human**
1890 **Reproduction**, v. 9, p. 2044–2050, 1994.
- 1891 Lewis SE, Sterling ES, Young IS and Thompson W. Comparison of individual
1892 antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility Steril**, v.
1893 67, p. 142–147, 1997.
- 1894 Lin, T. Regulation of Leydig cell function by insulin-like growth factor-I and binding
1895 Proteins. **Journal of Andrology**, v.16, p.193–196, 1995.
- 1896 Liu Z, Foote RH, Brockett C. Survival of bull sperm frozen at different rates in media
1897 varying in osmolarity. **Cryobiology**, v. 37, p:219-230, 1998.
- 1898 Macpherson, M.L.; Simmen, R.C.M.; Simmen, F.A.; Insulin-like growth factor-I and
1899 insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 in equine seminal plasma:
1900 association with sperm characteristics and fertility. **Biological Reproduction**, v.67
1901 p.648–654, 2002.
- 1902 Maia, M.S.; Bicudo, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em
1903 mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte,
1904 v.33, n.4, p.183-193, 2009.
- 1905 Maia, M.S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio
1906 (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio
1907 (OEP), trolox-c e catalase. 2006. 147f. **Tese (Doutorado)**, Faculdade de Medicina
1908 Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP.

- 1909 Mazur, P. Basic concepts in freezing cell. In: Deep freezing of boar semen, 1985,
1910 Uppsala. **Proceedings**. Uppsala, p.199- 222, 1985.
- 1911 Maxwell, W.M.C.; Watson, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen,
1912 **Anais Reproductions Science**. v. 42: 1-4, p. 55-65, 1996.
- 1913 Medeiros, C.M.O.; Forell, F.; Oliveira, A.T.D.; Rodriguez, J.L. Current status of sperm
1914 cryopreservation: why isn't better. **Theriogenology**, v. 57, p.327-340, 2002.
- 1915 Meseguer, M.; Garrido, N.; Simo'n, C.; Pellicer, A.; Remohí, J. Concentration of
1916 glutathione and expression of glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provide a
1917 forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Journal of**
1918 **Andrology**, v. 25, p.773–780, 2004.
- 1919 Minelli, A.; Moroni, M.; Castellini, C. Isolation and purification of the IGF-1 protein
1920 complex from rabbit seminal plasma. Effects on sperm motility and viability. *Journal of*
1921 **Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 290, p.279-
1922 290, 2001.
- 1923 Misro, M.M.; Choudhury, L.; Upreti, K.; Gautam, D.; Chaki, S.P.; Mahajan, A.S.;
1924 Babbar, R. Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative
1925 stress in subjects presenting a normal semen profile. **International Journal of**
1926 **Andrology**, v. 27, p.82-87, 2004.
- 1927 Moussa, M.; Martinet, V.; Trimeche, A.; Tainturier, D.; Anton, M. Low density
1928 lipoproteins extracted from hen egg yolk by a easy method: cryoprotective effect on
1929 frozen – thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1695-1706, 2002.
- 1930 Neagu, V.R.; García, B.M.; Sandoval, C.S.; Rodríguez, A.M.; Ferrusola, C.O.;
1931 Fernández, L.G.; Tapia, J.A.; Peña, F.J. Freezing dog semen in presence of the
1932 antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity.
1933 **Theriogenology**, 73, 645–650, 2010.
- 1934 Neid, D.M.; Gadella, B.M.; Collenbrander, B. Lipid peroxidation in stallion
1935 spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 295-298, 2002
- 1936 Nichi, M.; Goovaerts, I.G.F.; Barnabe,V.H.; De Clerco, J.B.P.; Bols, P.E.J. Roles of
1937 lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on *in vitro* fertilization capacity of sperm
1938 collected fro bovine epididymides stored at 4 and 34°C. **Theriogenology**, v.67, p.334-
1939 340, 2007.
- 1940 Nishikimi, M.; Machlin, L.J. Oxidation of α tocopherol model compound by superoxide
1941 anion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 170, p. 684-689, 1975.
- 1942 Nordberg, J.; Arnér, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian
1943 thioredoxin system. **Free Radical Biological Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.
- 1944 O'Flaherty, C.; Beconi, M.; Beorlegui, N. Effect of natural antioxidants, superoxide
1945 dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen–thawed bull spermatozoa,
1946 **Andrology**, v. 29, p. 269–275, 1997.
- 1947 Oliveira, R.A. Antioxidantes na viabilidade do sêmen equino congelado e resfriado.
1948 **Tese de Doutorado** – Universidade Federal de Goiás, 2011.

- 1949 Ortega, A.M.; Izquierdo, A.C.; Gomez, J.J.H.; Olivares-Corichi, I.M.; Torres, V.M.M.;
 1950 Méndez, J.J.V. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: una
 1951 revisión. **Interciência**, v.28, p.699-704, 2003.
- 1952 Pacheco, A.; Quirino, C.R.; Silva, J.F.S.; Cunha, I.C.N.; Bucher, C.H. Effect of age and
 1953 farm factors on seminal characteristics and scrotal circumference in Guzera bulls raised
 1954 in the north and northwest region of Rio de Janeiro/ Brasil. **Archivos**
 1955 **Latinoamericanos de Produccion Animal**, v. 15, p. 157-165, 2007.
- 1956 Padilha, R.T.; Magalhães-Padilha, D.M.; Cavalcante, M.M.; Almeida, A.P.; Haag, K.T.;
 1957 Gastal, M.O.; Nunes, J.F.; Rodrigues, A.P.R.; Figueiredo, J.R.; Oliveira, M.A.L. Effect
 1958 of insulin-like growth factor-I on some quality traits and fertility of cryopreserved ovine
 1959 sêmen. **Theriogenology**, v. 78, p. 907–913, 2012.
- 1960 Parks, J.E.; Graham, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes.
 1961 **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.
- 1962 Pegg, D.E. The History and Principles of Cryopreservation. Seminars. **Reproductive**
 1963 **Medicine**, v.20, n.1, p.05-14, 2002.
- 1964 Peixoto, P.C.V.A.; Coletto, Z.F.; Moura, C.S.; Almeida, F.C.; Soares, P.C.; Silva, S.V.;
 1965 Guerra, M.M.P. Effect of Trolox and glutathione reduced (GSH) addition on the *in vitro*
 1966 viability of dog cryopreserved sperm. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, 2013.
- 1967 Plante M, de Lamirande E and Gagnon C. Reactive oxygen species released by
 1968 activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal
 1969 sperm motility. **Fertil Steril**. v.62, p. 387–393, 1994.
- 1970 Purdy, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**,
 1971 v.63, p.215-225, 2006.
- 1972 Pursel, V.G., Johnson, L.A.; Schulmann, L.L. Lossof boar sperm fertilizing capacity
 1973 associated with altered acrosome morphology during in vitro storage. In: VIIIth
 1974 **International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, v.3,
 1975 p.141-1525-1600, 1972.
- 1976 Quetglas, M.D.; Coelho, L.A.; Garcia, J.M. Effect of insulin-like growth factor-1 during
 1977 in vitro oocyte maturation and in vitro culture of bovine embryos. **Brazilian Journal of**
 1978 **Veterinary and Animal Sciences**, v.53, p.207-211, 2001.
- 1979 Raijmakers, M.T.M.; Roelofs, H.M.J.; Steegers, E.A.P. Glutathione and glutathione s-
 1980 transferases Al-1 and Pl-1 in seminal plasma may play a role in protecting against
 1981 oxidative damage to spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 1, p. 169-172, 2003.
- 1982 Reddy, N.S.S.; Mohanarao, G.J.; Atreja, S.K. Effects of adding taurine and trehalose to
 1983 a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalua bubalis*) sperm quality following
 1984 cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.119, p.183-190, 2010.
- 1985 Renesto, A. Associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultra-sonografia
 1986 e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos. **Dissertação**
 1987 **(Mestrado)** - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual
 1988 Paulista, Jaboticabal, 2004.
- 1989

- 1990 Ruckebusch, Y.; Phaneuf, L.P.; Dunlop, R. The urinary collecting and voiding system.
1991 **Physiology of Small and Large Animals**, v. 12, p. 184-188, 1991.
- 1992 Sabeur, K.; Ball, B.A. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa.
1993 **American Journal of Veterinary Research**, v.67, p.701-706, 2006.
- 1994 Sariozkan, S.; Bucak, M.N.; Tuncer, P.B.; Ulutas, P.A.; Bilgen, A. The influence of
1995 cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of
1996 bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, p.134-138, 2009
- 1997
- 1998 Sánchez-Luengo, S., Fernández, P.J. and Romeu, A. "Insulin Growth Factors may be
1999 Implicated in Human Sperm Capacitation". **Fertility and Sterility**, v. 83. 2005
- 2000 Sanocka–Maciejewska D, Ciupinska M and Kurpisz M. Bacterial infection and semen
2001 quality. **Journal Reproduction Immunologic**, v. 67, p. 51–56, 2005.
- 2002 Sanocka, D.; Kurpisz, M. Reactive oxygen species and sperm cell. **Reproduction**
2003 **Biological Endocrinologic**, v. 2, p.12, 2004.
- 2004 Sarlos, P.; Molnar, A.; Kokai, M.; Gabor, G.Y.; Rátky, J. Comparative evaluation of the
2005 effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinary Hung**, v.50,
2006 p.235-245, 2002.
- 2007 Schuppe, H.C.; Meinhardt, A.; Allam, J.P.; Bergmann, M.; Weidner, W.; Haidl, G.
2008 Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? **Andrology**, v.40, p. 84-91, 2008.
- 2009 Selvaraju, S.; Nandi, S. Subramani, T.S.; Raghavendra, B.S.; Rao, S.B.N.; Ravindra,
2010 J.P. Improvement in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa functional parameters and
2011 fertility in vitro: Effect of insulin-like growth factor-I. **Theriogenology** , v. 73, p.1–10,
2012 2010.
- 2013 Selvaraju, S.; Reddy, I.J.; Nandi, S.; Rao, S.B.N.; Ravindra, J.P. Influence of IGF-I on
2014 buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation
2015 and fructose uptake in vitro; **Animal Reproduction Science**, v.113, p. 60–70, 2009.
- 2016
- 2017 Silva, S.V. Avaliação de espermatozoides ovinos criopreservados em Tris-gema
2018 acrescido de antioxidante enzimáticos e não-enzimáticos. **Tese(Doutorado em Ciência**
2019 **Veterinária)** – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 114f, 2010.
- 2020 Silva, S.V., Guerra, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e
2021 alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira Reprodução Animal**,
2022 v.35, n.4, p.370-384, 2011.
- 2023 Silva, D.M.; Zangeronimo, M.G.; Murgas, L.D.S.; Rocha, L.G.P.; Chaves, B.R.;
2024 Pereira, B.A.; Cunha, E.C.P. Addition of IGF-I to storage-cooled boar semen and its
2025 effect on sperm quality. **Growth Hormone & IGF Research** , v.21, p. 325–330, 2011.
- 2026 Silva, S.V.; Silva, E.C.B.; Souza, H.M.; Guerra, M.M.P. Ação da glutatona reduzida na
2027 criopreservação do sêmen caprino em diferentes tempos de estabilização. **Ciência**
2028 **Animal**, 2012.

- 2029 Sinha MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL. The effect of glutathione on motility,
2030 enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**,
2031 v.41, p.237-243, 1996.
- 2032 Soares, A.T.; Guerra, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade
2033 espermática. **Tecnologia & Ciência. Agropecuária.**, João Pessoa, v.3, n.2, p.53-63,
2034 jun. 2009.
- 2035 Soares, A.T.; Silva, S.S.; Almeida, F.C.; Lemos, P.F.B.A.; Nunes, J.F.; Peixoto, C.A.;
2036 Guerra, M.M.P. Espermatozoides caprinos criopreservados em meio à base de leite
2037 desnatado acrescido de glutathione reduzida. **Ciência Rural**, v.41, n.11, p.1991-1997,
2038 2011.
- 2039 Soares, A.T.; Silva, S.V.; Lemos, P.F.B.A. Atividade mitocondrial, integridade de
2040 membrana plasmática e motilidade de espermatozoides caprino submetidos à
2041 criopreservação em meio adicionado de glutathione reduzida. In: **SINCORTE –**
2042 **Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte**, 4, João Pessoa – PB, 2009.
- 2043 Song, X.M.; Lu, S.S.; Wang, M. Li, Q.Y.; Li, D.; Yang, X.G. Addition of Glutathione
2044 to Semen Extender During Sperm Sorting can Improve *in vitro* Embryonic
2045 Development and *in vivo* Fertility in Buffalo. **Journal of Animal and Veterinay**
2046 **Advancee**, v. 11 (23), p. 4482-4488, 2012.
- 2047 Souza, F.A. Perfil eletroforético de proteínas e concentrações de leptina, insulina e IGF-
2048 I do plasma seminal de tourinhos Gir-Leiteiros na peripuberdade. **Tese: UFMG**. Belo
2049 Horizonte-MG, 114p, 2011.
2050
- 2051 Spiteri-Grech, J.; Nieschlag, E. Paracrine factors relevant to the regulation of
2052 spermatogenesis – a review. **Journal Reproduction and Fertility**, v.98, n.1, p.1-14,
2053 1993.
- 2054 Spiteri-Grech, J.; Nieschlag, E. The role of growth hormone and insulin-like growth
2055 factor I in the regulation of male reproductive function, **Hormone Research**, v. 38, p.
2056 22–27, 1992.
- 2057 Squires, E.L.; Pickett, B.W.; Graham, J.K.; Vanderwall, D.K.; Mccue, P.M.; Bruemmer,
2058 J. Cooled and frozen Stallion Semen. **Animal Reproduction and Biotechnology**
2059 **Laboratory**, bulletin, N. 9, p. 80, 1999,
- 2060 Strzezek, J. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. **Reproductive Biology**,
2061 v.2, n.3, 2002
- 2062 Stradaoli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSH) content in
2063 bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders.
2064 **Theriogenology**, v.67, p.1249-1255, 2007.
- 2065 Stradaoli, G.; Sylla, L.; Monaci, M.; Maiorino, M. Phospholipid hydroperoxide
2066 glutathione peroxidase in bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for
2067 semen quality analysis. **Theriogenology**, v.72, p.1– 8, 2009.
- 2068 Sztejn, J.M.; Noble, K.; Farley, J.S. et al. Comparison of permeating and nonpermeating
2069 cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 42, n. 1, p. 28-39,
2070 2001.

- 2071 Tavalani, H.; Doosti, M.; Saeidi, H. Malondialdehyde levels in sperm and seminal
2072 plasma of asthenozoospermic and its relationship with sêmen parameters. **Vlinical**
2073 **Chimistry Acta**, v. 356, p. 199-203, 2005.
- 2074 Tena-Sempere, M.; Barreiro, M.L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm.
2075 **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.188, n.1-2, p. 9-13, 2002.
- 2076 Totic, J.; Walton, A. Metabolism of spermatozoa. Formation of hydrogen peroxide by
2077 spermatozoa and its effects on motility and survival, **Biochem Journal**, v.47, p. 199–
2078 212, 1950.
- 2079 Trincherro, G.D.; Affranchino, M.A.; Shang, L.M.; Beconi, M.T. Antioxidant effect of
2080 bovine spermatozoa on lipid peroxidation. **Com Biologic**, v.8, p.339- 350, 1990.
- 2081 Tuncer, P.B.; Bucak, M.N.; Buyukleblebici, S.; Sariozkan, S.; Yeni, D.; Eken, A.;
2082 Akalm, P.P.; Kinet, H.; Avdatek, F.; Fidan, F.; Gundogan, M. The effect of cysteine and
2083 glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen.
2084 **Cryobiology**, v. 61, p. 303–307, 2010.
- 2085 Uysal, O.; Bucak, M.N. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine
2086 and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. **Acta Veterinaria Brno**, v.76,
2087 p.383-390, 2007.
- 2088 Valença, R.M.B.; Guerra, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização
2089 de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira Reprodução**
2090 **Animal**, v.31, p.47-53, 2007.
- 2091 Valente, S.S.; Pereira, R.M.; Baptista, M.C.; Marques, C.C.; Vasques, M.I.; Silva
2092 Pereira, M.V.C.; Horta, A.E.M.; Barbas, J.P. In vitro and in vivo fertility of ram semen
2093 cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**, v.117, p. 74–77,
2094 2010.
- 2095 Van der Ven H.H.; Jeyendran, R.S.; AL-Hasani, S.; Perez-Pelaez, M.; Dietrich, K.;
2096 Zaneveld, L.J.D. Correlation between human sperm swelling in hyposmotic medium
2097 (hyposmotic swelling test) and in vitro fertilization. **Journal Andrology**, v. 7, p.190-
2098 196, 1986.
- 2099 Velazquez, M.A.; Spicer, L.J.; Wathes, D.C. The role of endocrine insulin-like growth
2100 factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction Domestic Animal **Endocrinology**, v. 35,
2101 p. 325–342, 2008.
- 2102 Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onclin, K. Computer assisted semen analyzers in
2103 andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179,
2104 2005.
- 2105 Vishwanath, R.; Shannon, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state.
2106 **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 23-53, 2000.
- 2107 Vickers, M.H.; et al. IGF-1 treatment increases motility and improves morphology of
2108 immature spermatozoa in the GH-deficient dwarf (dw/dw) rat. **Growth Hormone &**
2109 **IGF Research**, v. 9, p. 236-240, 1999.

- 2110 Zabludovsky, N.; Eltes, F.; Geva, E.; Brkovitz, E.; Amit, A.; Barak, Y.; Hareven, D.
 2111 Bartoov, B. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive
 2112 quality parameter and IVF outcome. **Andrology**, v.31, p.91-98, 1999.
- 2113 Zini, A.; de Lamirande, E.; Gagnon, C. Reactive oxygen species in semen of infertile
 2114 patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma
 2115 and spermatozoa. **International Journal of Andrology**; v.16, p. 183-188, 1993.
- 2116 Wang, G.; Hardy, M.P. Development of Leydig cells in the insulin-like growth factor-I
 2117 (igf-I) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation.
 2118 **Biologic Reproduction**, v.70, p.2-9, 2004.
- 2119 Walczak-Jedrzejowska, R.; Wolski, J.K.; Slowikowska-Hilczner, J. The role of oxidative
 2120 stress and antioxidants in male fertility. **Central European Journal of Urology**, v. 66,
 2121 p. 60-67, 2013.
- 2122 Watson, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**
 2123 **Reproduction Science**, v.60, p.81-92, 2000.
- 2124 Watson, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa
 2125 and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and**
 2126 **Development**, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.
- 2127 Wolski, J.K. Rola mikroelementów i witamin w niepłodności męskiej [Role of trace
 2128 elements and vitamins in male infertility]. **Przeegl Urology**, v. 4, p. 1-4, 2011..
- 2129 Yamamoto, K.; Komatsu, Y.; Yokoo, Y.; Furukawa, T. Delaying flower opening of cut
 2130 roses by *cis*-propenylphosphonic acid. **Journal of the Japan Society of Horticulture**
 2131 **Science**, v.63, p.159-166, 1994.
 2132

2133 **ANEXOS**

2134

2135 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

2136

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

Fonte: Leite, 2008