



Universidade Estadual do Maranhão
Centro de Ciências Agrárias
Mestrado em Ciência Animal

Sâmara Cristine Costa Pinto

**Criopreservação de sêmen bovino com antioxidantes: avaliações
funcionais e fecundação *in vitro***

São Luís- MA
2015



Universidade Estadual do Maranhão
Centro de Ciências Agrárias
Mestrado em Ciência Animal

Sâmara Cristine Costa Pinto

**Criopreservação de sêmen bovino com antioxidantes: avaliações
funcionais e fecundação *in vitro***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Conservação e Reprodução Animal

Orientador: Fernando Andrade Souza – UEMA/UFAC

São Luís- MA
2015



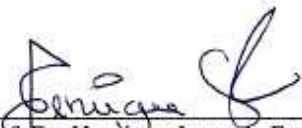
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFAC

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Taxa de embriões bovinos produzidos in vitro utilizando sêmen criopreservado com antioxidante”**, processo número **23107.009837/2015-16 e protocolo número 50/2015** sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Andrade Souza, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Acre e foi aprovada em reunião de **23/07/2015**.

We certify that the research **“Taxa de embriões bovinos produzidos in vitro utilizando sêmen criopreservado com antioxidante”** process number **23107.009837/2015-16 and protocol number 50/2015** 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.



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

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

Pinto, Sâmara Cristine Costa.

Criopreservação de sêmen bovino com antioxidantes: avaliações funcionais e fecundação in vitro. – São Luís, 2014.

XXf

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Andrade Souza

1.Espécies reativas de oxigênio; clivagem; sêmen. I.Título

CDU:XXX.XXX.XXX

Sâmara Cristine Costa Pinto

Criopreservação de sêmen bovino com antioxidantes: avaliações funcionais e fecundação *in vitro*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Conservação e Reprodução Animal

Orientador: Fernando Andrade Souza – UEMA/UFAC

Aprovada em ___/___/_____

Prof. Dr. Fernando Andrade Souza
Orientador

Prof^a. Dr^a. Eneiva Carla Carvalho Celeghini
1º membro

Prof. Dr. Ricardo de Macedo Chaves
2º membro

Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos
3º membro

Quem sai à guerra precisa de orientação e que com muitos conselheiros se obtém a vitória

Provérbios 24.6

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charlie Chaplin

A satisfação está no esforço e não apenas na realização final.

Mahatma Gandhi

Dedico esse trabalho a todos aqueles que contribuíram para execução do mesmo, em especial minha família e meu noivo, Giovanni.

Agradecimentos

Á Deus, por que sem Ele jamais teria realizado esse experimento.

Á Família pelo apoio e incentivo, ajudando sempre que possível.

Ao meu noivo Giovani, pelo carinho, apoio, ajuda na execução do experimento. Obrigado também por existir na minha vida. A sua presença foi fundamental em tudo que conquistei.

Profa Alessandra Corallo Nicacio agradeço profundamente. Costumo dizer que tudo que sou academicamente foi graças a ela. Um marco importante foi quando a professora teve que se ausentar da instituição, de repente, eu senti que tudo que eu e meus amigos tínhamos conquistado ia ser destruído, erro. Hoje, eu agradeço imensamente, pois foi a partir desse momento que conquistei a maturidade profissional. Para resumir, agradeço e sempre agradecerei a minha eterna orientadora Alessandra.

Ao orientador, Fernando Andrade Souza, por ser essa pessoa tão amiga e sempre disponível. Assim como a Profa Alessandra, contribuiu no que sou hoje.

Ao Professor Ricardo e Felipe Jr. pela ajuda, principalmente na produção de embriões in vitro.

À Co-Orientadora Eneiva Carla Carvalho Celeghini agradeço imensamente pela grande ajuda e também por acreditar no meu potencial. Muito obrigada.

Ao Prof. André Furugen e Prof. Rubens pela disponibilidade do laboratório para execução do experimento.

Aos Profs. do VRA/USP, em especial prof. Mário, que abriram as portas do VRA para a realização do estágio curricular e do projeto de Mestrado.

Aos amigos do VRA/USP, em especial a Maíra e a Shirley, que contribuíram imensamente na execução do experimento. A Patrícia que em tantos momentos contribuiu para superar a distância, aos domingos que tínhamos que lavar roupa ou mesmo sair do quarto na tentativa de fazer exercício físico, e agora que me ajudou baixando uns duzentos artigos kkk. Imensamente obrigada.

A Juh, gaúcha, que ajudou bastante baixando uns artigos e também por fazer meu estágio mais alegre.

Aos Profs. do Mestrado/ Uema, pelo aprendizado e, como também, na formação.

À Turma do Mestrado Uema, como costumo dizer, a extensão da minha sala de graduação, kk, muito obrigada pelos momentos de alegria.

Aos amigos, Naia, Maysa, Monique, Paula, Diego e Israel, vish até complicado de falar. Muito obrigada, pois quando precisei correr no matadouro, ir de fazenda em fazenda,

selecionar e coletar os touros, sempre e sempre estavam sempre presentes. Muito obrigada brothers!

A menina Eliza, um presente na minha vida! Veio para alegrar nos dias de tristeza.

Andresa Bologna, agradeço imensamente pela amizade, que foi construída no acaso e hoje é uma peça fundamental. Obrigada por me ouvir e me fazer rir em vários momentos, sempre dando força. Distância não impede amizade e a nossa comprova tal afirmação.

Aos estagiários do laboratório de Reprodução Animal da UEMA, em especial a Wayllba. Por toda ajuda nas aspirações foliculares como também nas piadas e brincadeiras durante o convívio no laboratório.

Aos proprietários da fazenda Hidraely, fazenda Alana e frigorífico DA Vital, pois forneceram os animais como também os ovários utilizados no experimento.

A FAPEMA pela concessão da bolsa.

Muito obrigada!!!

Criopreservação de sêmen bovino com antioxidantes: avaliações funcionais e fecundação *in vitro*

Autora: Sâmara Cristine Costa Pinto

Orientador: Fernando Andrade Souza

Co-orientador: Eneiva Carla Carvalho Celeghini

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a adição de antioxidantes no processo de criopreservação de sêmen bovino, a partir de testes complementares (motilidade e vigor espermáticos pós – criopreservação, teste de termorresistência rápido, integridade de membranas plasmática e acrossomal, estresse oxidativo e morfologia espermática) e na fecundação *in vitro* (FIV). Para tanto, o ejaculado de nove animais foram dividido em quatro frações, correspondente a cada tratamento, sendo estes: grupo controle – sêmen diluído com extensor Tris – gema; grupo vitamina – sêmen diluído em Tris – gema acrescido de 2,5 mM/mL de vitamina C; grupo glutatona – sêmen diluído em Tris – gema acrescido de 2,5 mM/mL de glutatona reduzida e o grupo associado – sêmen diluído em Tris – gema acrescido de vitamina C e glutatona reduzida com metade das concentrações (1.25mM/mL). Posteriormente o sêmen foi envasado em palhetas francesas e submetidas a criopreservação utilizando equipamento automatizado TK-3000[®]. Para FIV, ovários de abatedouros foram aspirados para obtenção dos oócitos grau I e II. Estes foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV), seguida de fertilização *in vitro* (FIV) onde cada gota contendo os oócitos maturados, foi adicionada o sêmen capacitado correspondente a cada tratamento. A taxa de fecundação foi atribuída de embriões divididos em dois ou mais blastômeros. Houve diferença estatística ($P < 0,05$) na motilidade espermática para o grupo associado, contudo para vigor espermático os grupos não diferiram, o mesmo ocorreu para integridade de membrana plasmática e acrossomal. O grupo associado apresentou maior percentual de células com estresse oxidativo ($P < 0,05$) e menores percentuais de defeitos espermáticos maiores. O grupo glutatona apresentou maior taxa de fecundação ($P < 0,05$). Dessa forma, concluiu-se que a associação da vitamina C e glutatona reduzida favoreceu a motilidade espermática pós descongelação, porém os antioxidantes não apresentaram efeito preventivo quanto aos danos estruturais sofridos pelas membranas plasmáticas. E que associação dos antioxidantes proporciona maior estresse oxidativo e o uso de glutatona reduzida garante maior capacidade fecundante.

Palavras-chave: clivagem, espécies reativas de oxigênio, sêmen

Bovine semen cryopreserved with antioxidants: functional ratings and in vitro fertilization

Author: Sâmara Cristine Costa Pinto

Leader: Fernando Andrade Souza

Co – leader: Eneiva Carla Carvalho Celeghini

Abstract

The aim of this study was to evaluate the addition of antioxidants in cryopreservation process of bovine semen, from complementary tests (stamina and sperm motility post thawing, quick thermos-resistance test, acrosomal and plasma membranes integrity, oxidative stress and sperm morphology) and in in vitro fertilization (IVF). Therefore, the ejaculate from nine animals was divided in four fractions, corresponding to one treatment each, these being: control group – semen diluted in Tris – yolk; vitamin group – semen diluted in Tris – yolk plus 2.5 mM/mL of vitamin C; glutathione group – semen diluted in Tris – yolk plus 2.5 mM/mL of reduced glutathione and associated group – semen diluted in Tris – yolk plus half of the concentration (1.25 mM/mL), later the semen was packed into french straws and submitted to cryopreservation through an automatized equipment, TK 3000[®]. For IVF, ovaries from slaughterhouses were aspirated to obtain oocytes grades I and II. These were submitted to in vitro maturation (IVM) followed by IVF; where each drop containing the matured oocytes, was combined with the capacitated semen, corresponding to each treatment. Fertilization rate was assigned to embryos divided into two or more blastomeres. There was statistical difference ($P < 0.05$) for sperm motility for the associated group, however the groups didn't differ for sperm stamina, the same occurred to acrosomal and plasma membranes integrity. The associated group showed higher percentage of cells with oxidative stress ($P < 0.05$) and smaller percentage for major sperm defects. Glutathione group showed higher fertilization rate ($P < 0.05$). Therefore, we can conclude that the association of vitamin C and reduced glutathione favored sperm motility post thawing, however, the antioxidants didn't show a preventive effect about the structural damage suffered by plasma membranes. And that the association of the antioxidants provides higher oxidative stress and the use of reduced glutathione guarantees increased fertilizing capacity.

Key words: cleavage, reactive species of oxygen, sperm

Sumário

1. Introdução.....	17
2. Revisão de literatura.....	19
2.1 Espermatozoide e membranas plasmáticas.....	19
2.2 Criopreservação de sêmen bovino.....	21
2.3 Estresse oxidativo e espécie reativa de oxigênio.....	24
2.4 Antioxidantes.....	28
3. Testes funcionais para avaliação espermática.....	32
3.1 Testes para o estresse oxidativo.....	35
4. Produção <i>in vitro</i>	36
5. Hipótese.....	39
6. Objetivo Geral.....	39
6.1 Objetivo Especifico.....	39
7. Material e Métodos.....	40
7.1 Local.....	40
7.2 Diluidores para criopreservação de sêmen.....	40
7.3 Criopreservação e descongelamento.....	41
7.4 Testes espermáticos.....	41
7.4.1 Motilidade e vigor espermático pós – criopreservação.....	41
7.4.2 Teste de termorresistência rápido.....	42
7.4.3 Eosina – Nigrosina.....	42
7.5 Teste de avaliação das membranas plasmáticas pós – criopreservação.....	42
7.6 Estresse oxidativo pós – criopreservação.....	43
7.7 Morfologia espermática pós – criopreservação.....	43
7.8 Fecundação <i>in vitro</i>	43
8. Análise Estatística.....	44
9. Resultado e Discussão.....	45
9.1 Avaliações externas e análises prévias.....	45
9.2 Motilidade e vigor espermático pós – criopreservação.....	47
9.3 Membranas plasmáticas.....	52
9.4 Avaliação do estresse oxidativo.....	54
9.5 Morfologia espermática.....	57
9.6 Fecundação <i>in vitro</i>	59
Conclusão.....	64
Referências Bibliográficas.....	64
Anexos.....	76

Lista de Tabelas

Tabela 1. Média e desvio padrão da biometria testicular e análises prévias dos animais utilizados experimentalmente, São Luís – 2015, São Luís – MA, 2015.....	47
Tabela 2. Média e desvio padrão da motilidade espermática dentro de tempo avaliada pelo teste de termorresistência rápida (TTR), São Luís – 2015.....	51
Tabela 3. Médias e desvios padrão do vigor espermático para os animais tratados com Vitamina C, glutathione reduzida e associação, São Luís – 2015.....	52
Tabela 4. Médias e desvios padrão (%) da integridade de membranas e integridade de acrossoma para os animais tratados com vitamina C, glutathione reduzida e associação dos antioxidantes, São Luís – 2015.....	53
Tabela 5. Percentual de embriões sobre o total de óocitos fecundados de acordo com cada tratamento das sete repetições da produção <i>in vitro</i> , São Luís – 2015....	62

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Média e erro padrão de motilidade espermática pós - criopreservação para os animais tratados com Vitamina C, glutathiona reduzida e associação, São Luís – 2015.....	48
Gráfico 2. Médias e erro padrão para estresse oxidativo para os animais tratados com Vitamina C, glutathiona reduzida e associação, São Luís – 2015.....	55
Gráfico 3. Médias e erro padrão para percentual de células vivas para os animais tratados com Vitamina C, glutathiona reduzida e associação, São Luís – 2015.....	57
Gráfico 4. Médias e erro padrão para defeitos maiores e menores para os animais tratados com Vitamina C, glutathiona reduzida e associação, São Luís – 2015.....	58
Gráfico 5. Médias e erro padrão para defeitos menores para os animais tratados com Vitamina C, glutathiona reduzida e associação, São Luís – 2015.....	59
Gráfico 6. Taxa de fecundação in vitro, clivagem, com sêmen suplementado com Vitamina C, glutathiona reduzida e associação, São Luís – 2015.....	60

Lista de Figuras

Figura 1. Formação das espécies reativas de oxigênio	18
Figura 2: Reação de dismutação do radical superóxido.....	21
Figura 3: Ação da catalase sobre o peróxido de hidrogênio.....	22
Figura 4: Metabolismo da glutathiona.....	22
Figura 5: Estrutura da Vitamina C.....	24

Lista de abreviaturas e símbolos

>	Maior
<	Menor
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
mL	Mililitro
AI	Acrossoma íntegro
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
CBRA	Colegio Brasileiro de Reprodução Animal
CO ₂	Dióxido de carbono
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DIC	Microscopia de contraste diferencial de fase
FeSO ₄	Sulfato de ferro
Fe ⁺	Íons ferro
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GSH	Glutathiona reduzida
H33342	Hoechst 33342
H33258	Hoechst 33258
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
OH	Hidróxido
O ₂	Oxigênio
PE	Perímetro escrotal
PI	Membrana plasmática íntegra
PIAI	Membranas plasmática e acrossomal íntegras
PIV	Produção <i>in vitro</i>
ROS	Espécie reativa de oxigênio
TBARS	Ácido tiobarbitúrico
TK	Máquina de congelação de sêmen
TTR	Teste de termorresistência rápida

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

1. Introdução

As biotecnologias da reprodução como refrigeração, criopreservação de sêmen e inseminação artificial são utilizadas há bastante tempo em várias espécies de animais, principalmente as de interesse comercial (MESSIAS, 2000). A congelação do sêmen é uma biotécnica reprodutiva de grande importância para a indústria da produção animal, uma vez que rompe a barreira tempo-espaco pela preservação da viabilidade dos espermatozoides, possibilitando o transporte e o armazenamento do material genético (SILVA et al., 2012).

Esta por sua vez, tem sido amplamente utilizada para aumentar o potencial reprodutivo de touros de alto valor genético, sendo ferramenta imprescindível em programas de inseminação artificial, transferência e produção de embriões *in vitro*. O uso do sêmen congelado permite rápido avanço genético dos rebanhos comerciais, permitindo a escolha de reprodutores que melhor atendam às necessidades de produção (LEITE et al., 2011).

Porém, a criopreservação de sêmen é um processo de grande estresse celular, pois a sua diluição promove a redução da concentração de antioxidantes, resultando no desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, e, conseqüentemente, no estresse celular (BILODEAU et al., 2000), impondo aos espermatozoides condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade. Inúmeros trabalhos propõem que a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade oxidativa do sêmen potencializam os efeitos prejudiciais da criopreservação de sêmen (BUSTAMANTE – FILHO, 2006).

O termo, espécies de oxigênio reativas (ROS), se refere aos radicais livres ou espécies de oxigênio ativas, tais como, radical livre superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio (que não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério) e oxigênio singlete, que podem causar injúria oxidativa em membranas lipídicas, proteínas transmembranas e carboidratos, danificando ácidos nucléicos e despolimerizando ácidos hialurônicos (OCHSENDORF, 1999). Nos espermatozoides, especificamente, o ROS ocasiona danos estruturais ao acrossoma, a cabeça e a parte intermediária, como também dá início a apoptose e induz a fragmentação de DNA (CASTRO, 2010).

33 O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a concentração de antioxidantes
34 em relação à concentração de radicais livres, este fenômeno ocorre, geralmente, devido
35 à produção de ROS (NICHI, 2003). O conhecimento sobre os danos oxidativos
36 causados às células espermáticas decorrentes do desequilíbrio entre as concentrações
37 fisiológicas de oxidantes e antioxidantes, resultantes do aumento da produção de ROS
38 ou da redução da capacidade antioxidante total do sêmen, pode fornecer importantes
39 informações para melhorar a viabilidade espermática pós-congelação (GUERRA et al.,
40 2004).

41 Na produção *in vitro* os efeitos deletérios dos ROS também são observados
42 levando a uma lipoperoxidação da membrana plasmática dos gametas femininos e em
43 consequência acarreta na perda da produção e redução da fertilidade *in vitro*. Segundo
44 Borges (2008), o uso de antioxidantes nos diluidores pode aumentar as taxas de
45 clivagem e, conseqüentemente, de blastocistos.

46 Dessa forma, a adição de antioxidantes nos meios de criopreservação de sêmen é
47 uma alternativa promissora, pois eles se caracterizam por ser a principal defesa contra o
48 estresse oxidativo induzido por ROS, onde sua atuação consiste em fornecer hidrogênio
49 ao radical livre, estabilizando-o (CASTRO, 2010). Basicamente para os
50 espermatozoides, exerce função de preservar a sua motilidade e a sua habilidade na
51 capacitação e reação acrossomal (GUERRA et al., 2004). Assim, o presente trabalho
52 tem como objetivo avaliar a adição de antioxidantes no processo de criopreservação de
53 sêmen bovino, a partir de testes complementares e fecundação *in vitro*.

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69 **2. Revisão de Literatura**

70

71 *2.1. Espermatozoide e membranas plasmáticas*

72 A espermatogênese, processo de formação das células espermáticas, promove a
73 diferenciação celular das espermatogônias com sucessivas divisões mitóticas e
74 transformações citológicas seguida de uma divisão meiótica formando os
75 espermátócitos. Na base dos túbulos seminíferos, os espermátócitos sofrem divisão
76 meiótica resultando nas espermátides arredondadas, estas células se diferenciam e são
77 liberadas no lúmen dos túbulos, originando os espermatozoides (BARTH e OKO,
78 1989).

79 A espermatogênese está intimamente associada com a secreção dos esteroides,
80 gonadotrofinas e fatores de crescimento, como também ao suprimento de energia às
81 células responsáveis pela mobilidade, fornecidas pelas células de Sertoli (BARTH e
82 OKO, 1989; MARTIN-du PAN e CAMPANA, 1993).

83 Os espermatozoides, morfologicamente, são divididos em cabeça e flagelo com
84 uma porção central denominado de peça intermediária. A cabeça exerce função de
85 penetrar os oócitos e depositar os cromossomos, enquanto que o flagelo permite a
86 motilidade, para percorrer o trato reprodutivo. Já a peça intermediária é responsável pela
87 liberação de energia em forma de ATP para célula (MORTIMER, 1997).

88 Os espermatozoides são cobertos por membranas, que se diferenciam de acordo
89 com sua localização (FLESH e GODELLA, 2000), sendo estas a nuclear, mitocondrial,
90 acrossomal e plasmática. As membranas são compostas por lipídios e proteínas, e suas
91 principais funções são metabolismo celular, motilidade espermática, reação acrossomal,
92 capacitação e fecundação do oócito (LENZI et al, 1996; PENA et al., 2005).

93 A composição das membranas plasmáticas foi primeiramente descrita por Singer
94 e Nicholson em 1972. Contudo, somente em 1982, Houslay e Stanley, descreveram a
95 estrutura das mesmas, as quais são formadas por moléculas anfipáticas, compostas por
96 fosfolipídios, tendo no meio destas as proteínas integrais e periféricas (HAMMESTERD
97 et al, 1990; NOLAN e HAMMESTERD, 1997). A homeostase celular está intimamente
98 correlacionada com a integridade das membranas plasmáticas, atuando como barreira
99 dos meios intra e extracelular (AMMAN e PICKET, 1987).

100 No núcleo, encontra-se a cromatina, a qual possui o material genético, DNA,
101 fundamental para a formação do novo indivíduo (BARTH e OKO, 1989; MILLER et al,
102 2005).

103 A membrana mitocondrial encontra-se na porção anterior das fibras densas do
104 axonema, constituinte da peça intermediária, sendo recobertos por uma cápsula
105 mitocondrial com função de proteger as organelas dos espermatozoides (OTANI et al,
106 1988; URSINI et al, 1999). Basicamente, a função das mitocôndrias é de fornecer ATP,
107 sendo a energia importante para manter o estado ordenado do organismo vivo
108 (SCHAFER e BUETTNER, 2001), como também garantir a fecundação dos oócitos,
109 segundo Anderson e Dixson (2002). Estudos em humanos comprovam que defeitos na
110 estrutura mitocondrial comprometem a motilidade espermática, como também a
111 concentração (Amaral et al, 2007 e 2013).

112 As mitocôndrias são as principais formadoras das espécies reativas de oxigênio
113 (ROS) na cadeia transportadora de elétrons (BOVERIS e CHANCE, 1973). Alguns
114 autores acreditam que a formação se dá pela diaforase espermática (uma oxidoreduzida
115 NADPH-dependente), localizada na peça intermediária do espermatozoide e integrada à
116 cadeia respiratória mitocondrial (GAVELLA e LIPOVAC, 1992). A função do ROS nas
117 células espermáticas é de controlar a motilidade, capacitação, reação acrossômica,
118 hiperativação e capacidade de fecundação. Contudo, a produção exacerbada pode causar
119 danos oxidativo às células espermáticas (KOTHARI et al, 2010).

120 O estresse oxidativo nos espermatozoides ocorre devido à membrana
121 espermática possuir grandes quantidades de ácidos graxos insaturados enquanto que o
122 citoplasma possui pouca quantidade de enzimas capazes de debelar a ação do ROS
123 (JEDRZEJOWSKA et al, 2012), levando ao processo de peroxidação lipídica, o que
124 resulta na perda de suas funções (CHRISTOVA et al., 2004), da integridade do DNA
125 (BAUMBER et al., 2003), além de depleção de ATP, com perda de motilidade
126 espermática (De LAMIRANDE et al., 1997).

127 A membrana acrossomal localiza-se na cabeça do espermatozoide, divide-se em
128 região acrossomal e pós acrossomal. O acrossoma é formado na diferenciação das
129 espermátides pelo complexo de Golgi, sendo importante para a fecundação do oócito.
130 Para a penetração no *cumulus oophorus* é necessário à reação acrossômica, que permite
131 a passagem do espermatozoide através da zona pelúcida e posterior ligação com o
132 oolema do oócito. No acrossoma há enzimas como acrosina, hialuronidase e esterases,
133 que são importantes para degradação da corona radiata para penetração dos
134 espermatozoides (EDDY e O'BRIEN, 1994; ICKOWICZ e BREITBART, 2012).

135 A capacitação espermática é de fundamental importância para penetração nos
136 oócitos dos mamíferos, sendo modulada pelo próprio espermatozoide em meio

137 adequado (HUNTER et al, 1969; ACOTT et al, 1984). Durante a capacitação
138 espermática ocorrem mudanças na estrutura, como: depleção da relação
139 colesterol/fosfolípido na superfície do espermatozoide, aumento da fluidez da
140 membrana, alterações nas glicosaminoglicanas, entrada e saída dos íons cálcio,
141 mudanças nas proteínas quinases e aumento do AMP cíclico (WOLFE et al., 1998;
142 BILODEAU et al., 2000; FLESH e GADELLA, 2000; O'FLAHERTY et al., 2006).

143 No trato reprodutivo da fêmea a heparina é responsável pela reação acrossômica
144 no espermatozoide, como também proteínas quinases A, C e a tirosina proteína quinase
145 (BREITBART, 2003). A albumina também está envolvida na capacitação, atuando na
146 remoção do colesterol das membranas plasmáticas, tendo o colesterol, como função, o
147 aumento do pH, que favorece a capacitação espermática (CROSS, 1998).

148 *2.2 Criopreservação de sêmen bovino*

149 A conservação de sêmen foi iniciada por Smith e Polge em 1950, quando
150 relataram o efeito protetor do glicerol na sobrevivência espermática, após o processo de
151 criopreservação dos espermatozoides de várias espécies a -79 °C (BRANDÃO et al.,
152 2006). Lovelock e Bishop em 1959, em seus estudos, comprovaram o uso de
153 dimetilsulfóxido como agente protetor.

154 Mais tarde, estudiosos começaram a estudar e entender as crio injúrias causadas
155 pela criopreservação de sêmen, como o choque frio e o efeito solução, eventos
156 observados por Mazur et al. (1972). Atualmente, com avanços das biotecnologias ainda
157 há necessidade de estudos que incrementem o processo de criopreservação de sêmen,
158 preservando as características seminais das diferentes espécies.

159 A criopreservação de sêmen, por sua vez, compreende a busca pela suspensão do
160 metabolismo espermático e a manutenção de suas características por um período longo
161 de tempo e indeterminado, mantendo a capacidade fecundante dos espermatozoides
162 (KOMMISRUD et al., 1996).

163 Segundo Purdy (2006), a criopreservação dos espermatozoides nos mamíferos, é
164 um processo complexo, que envolve vários fatores na busca de resultados satisfatórios.
165 Segundo esse autor, para garantir o sucesso no procedimento são necessários
166 conhecimentos da fisiologia dos espermatozoides das diferentes espécies, como também
167 utilizar diluidores adequados, conhecer a taxa de resfriamento e descongelamento, a fim
168 de maximizar a recuperação pós-descongelamento e, conseqüentemente, melhores taxas
169 de fertilidade.

170 O avanço dessa biotecnologia veio com a descoberta da gema de ovo e do
171 glicerol como proteção no processo de resfriamento e congelamento espermáticos,
172 respectivamente (PHILLIPS e LARDY, 1940). Com o passar dos tempos, novas
173 técnicas foram introduzidas no protocolo de criopreservação a fim de estender as
174 metodologias dessa biotécnica para diversas espécies (SALAMON, 2000).

175 O congelamento de sêmen envolve as etapas de resfriamento, desidratação
176 celular, congelação e descongelação (MEDEIROS et al, 2002). Para uma correta
177 criopreservação das células espermáticas é necessário à interação entre os diluidores e
178 essas etapas, na tentativa de diminuir os danos no processo, como: choque frio,
179 desidratação e cristais de gelo (JASKO, 1994; YOSHIDA, 2000).

180 Mazur (1984) relata que a célula espermática é desafiada a resistir à temperatura
181 de -196 °C, contudo o maior obstáculo ocorre quando as células passam pelas
182 temperaturas intermediárias de 19 °C e 8 °C e -15 °C para - 60 °C. De acordo com
183 Medeiros et al. (2002), o sucesso da criopreservação ocorre quando há preservação da
184 fecundação. Dessa forma, busca a manutenção do flagelo para manter a produção de
185 ATP como também motilidade espermática; do núcleo para preservar o DNA; do
186 acrossoma para fecundação e o segmento equatorial para permitir a ligação com os
187 oócitos (HAMMERSTEDT, 1990).

188 Para a criopreservação das células espermáticas são utilizadas diferentes técnicas
189 dentre elas destacam-se as programadas ou automatizadas. Almquist e Wiggins (1973)
190 foram pioneiros na descrição da técnica automatizada. Contudo, somente em 1979,
191 Landa e Almquist, estudaram a técnica sobre a qualidade dos espermatozoides
192 submetidos ao processo de criopreservação. Atualmente, no mercado há inúmeros
193 equipamentos que realizam o processo do congelamento em diferentes protocolos, com
194 objetivo de manter a viabilidade espermática pós-descongelamento.

195 O sêmen criopreservado quando comparado com o fresco possui menor
196 viabilidade e fertilidade pós-criopreservação, oriundo de lesões celulares que ocorrem
197 durante o procedimento de congelamento (WATSON, 2000; MEDEIROS et al, 2002).
198 Ortega et al. (2003), afirmaram que células lesadas e apoptóticas aumentam
199 consideravelmente no sêmen congelado quando comparado com fresco,
200 independentemente da técnica utilizada. Cerca de 40 - 50% dos espermatozoides não
201 sobrevivem ao congelamento, mesmo utilizando protocolos adequados (WATSON,
202 2000).

203 Isto ocorre devido a grande parte dos espermatozoides sofrerem alterações na
204 funcionalidade, como também na integridade quando submetidas à criopreservação
205 (HOLT, 2000), resultante ao estresse celular e impondo condições desfavoráveis à
206 manutenção de sua viabilidade (PURDY, 2006).

207 Um ponto crítico, que leva a perda irreversível da viabilidade espermática e
208 cinética dos espermatozoides, segundo Watson (2000), é o choque frio que se define
209 como o conjunto de alterações ocorridas nas células espermáticas submetidas a uma
210 queda brusca de temperatura ($\pm 38^\circ$ para 5°C). Quando os espermatozoides sofrem o
211 choque térmico eles apresentam movimento circular fechado e anormais, perda de
212 motilidade acentuada, aumento de permeabilidade da membrana e danos acrossomais
213 (PICKET e AMANN, 1992). Outro fator é o efeito solução que, segundo Fayn (1980),
214 consiste na desidratação da célula devido a elevada concentração de soluto que resulta
215 na modificação do pH que leva a perda da funcionalidade dos espermatozoides.

216 O choque frio ocorre entre 15 e 5°C super-resfriam. Consequentemente, a água
217 e solutos também congelam no meio extracelular, resultando na alteração da
218 osmolaridade, levando a desidratação do espermatozoide (AMANN e PICKETT, 1987).

219 Para evitar o choque frio substâncias protetoras são utilizadas nos diluidores, por
220 exemplo, a gema de ovo e o glicerol. A ação protetora da gema de ovo ocorre de forma
221 extracelular pela presença das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e alto peso
222 molecular, sendo o componente de maior proporção na gema de ovo, cerca de 68%,
223 (WATSON, 1995; ANTON e GANDEMER, 1997), tendo também como função a
224 estabilização das membranas plasmáticas pela neutralização dos componentes deletérios
225 existentes no plasma seminal (AURICH, 1997), além de preservar a motilidade
226 espermática e a integridade do DNA (MANJUNATH et al., 2002; MOUSSA et al.,
227 2002). Já o glicerol tem ação intracelular, apresentando baixo peso molecular, alta
228 solubilidade e baixa toxicidade em concentrações adequadas. Sua ação é reduzir os efeitos
229 causados pela concentração dos solutos, evitar a formação dos cristais de gelo
230 intracelular e manter a osmolaridade interna e externa (DALIMATA e GRAHAM,
231 1997; PEGG, 2002).

232 A criopreservação de sêmen pode causar injúrias às membranas plasmáticas
233 (HAMMERSTEDT, 1990), as quais podem ser ocasionadas pela técnica utilizada
234 durante o congelamento, como: mudança de temperatura, ação dos componentes
235 presentes no diluidor e a descongelação (WATSON, 1995).

236 No intervalo de temperatura, de 20° a 5 °C, ocorrem as principais alterações nas
237 membranas, como ruptura e perda nos arranjos celulares. Neste intervalo, a membrana
238 plasmática altera a composição de líquido para gel, acarretando na diminuição da
239 motilidade e maior permeabilidade. As proteínas integrais, presentes nas membranas
240 plasmáticas, também podem sofrer modulações durante a criopreservação (WATSON,
241 1995, WATSON, 2000).

242 Durante a congelação de sêmen as membranas mitocondriais também podem ser
243 danificadas, resultando na condensação e perda de material (JONES e MARTINS,
244 1973). Quanto aos acrossomas também podem reagir durante a criopreservação, íons
245 cálcio são liberados culminando com a reação acrossômica precocemente o que resulta
246 na diminuição da taxa de fecundação com a desnaturação do DNA (PERIS et al., 2004;
247 SILVA e GADELLA, 2006).

248

249 *2.3 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio*

250 Espermatozoides criopreservados de mamíferos quando comparados com
251 espermatozoides frescos, não possuem uma boa fertilidade. Essa redução é decorrente a
252 menor viabilidade pós-descongelamento, por exemplo, oriunda do choque frio, como
253 também do estresse osmótico e oxidativo (PEÑA et al, 2003).

254 O estresse oxidativo é o desequilíbrio causado entre a produção das espécies
255 reativas de oxigênio (ROS) e da ação protetora do sistema antioxidante responsável por
256 sua neutralização e remoção (JEDRZEJOWSKA et al, 2012). Nutrição inadequada,
257 estresse, inflamações leucocitárias causadas por insuficiências de antioxidantes também
258 podem resultar em estresse oxidativo (ANDRADE et al, 2010), sendo que o esse estresse
259 causa lesão ao DNA, acelera a apoptose, promove a lipoperoxidação, a diminuição da
260 mobilidade, o que dificulta a morfologia normal dos espermatozoides, levando a
261 diminuição destes, ocasionando distúrbios na fecundação e desordens no embrião
262 (IWASAKI e GAGNON, 1992).

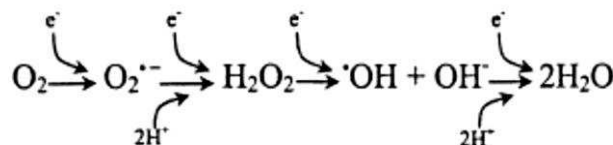
263 Todos os radicais e não radicais oriundos do oxigênio são considerados ROS,
264 possuem alta reatividade eletrônica, instabilidade podendo reagir com grande número de
265 compostos atuando como doadores ou receptores de elétrons (PIERCE et al, 2004;
266 AGARWAL et al., 2005). Considerados os principais causadores de danos aos
267 organismos vivos (BERNARD e KRAUSE, 2007).

268 De acordo com Boveris e Chance (1973), os principais formadores dos ROS são
269 as mitocôndrias, por meio da cadeia transportadora de elétrons. Nessas organelas, o

270 oxigênio sofre redução tetravalente resultando na formação de água. Esse processo
271 ocorre pela ação da enzima catalisadora, o citocromo oxidase. A ação dessa enzima é
272 controlar a formação das espécies reativas de oxigênio. No entanto, cerca de 2 a 5% do
273 oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados, sofrendo a redução e originando
274 os ROS (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

275 Outras fontes formadoras dos ROS são as enzimas NADPH oxidase, que por sua
276 vez, atuam transferindo os elétrons através das membranas celulares, formando o radical
277 O_2^- (GAVELLA e LIPOVAC, 1992; BERNARD e KRAUSE, 2007) e os leucócitos
278 polimorfonucleares, que também são envolvidos na produção dos ROS (AITKEN et al,
279 1994).

280 Entre os ROS, destacam-se o ânion superóxido (O_2^-), os peróxidos (H_2O_2) e os
281 radicais livres da hidroxila (OH), dentre eles o mais reativo e prejudicial. Os ROS são
282 formados a partir da adição de uma molécula de oxigênio originando o superóxido, o
283 qual através do processo de dismutação recebe um elétron e dois íons originando o
284 hidrogênio na forma de peróxido de hidrogênio, e, por fim, quando o peróxido de
285 hidrogênio recebe mais um elétron e um íon, forma-se o radical hidroxila, (Fig. 1;
286 NORDBERG e ARNÉR, 2001; SCHNEIDER e OLIVEIRA; 2004).



287

288 **Figura 1:** Formação das espécies reativas de oxigênio. Fonte: Nordberg e Arnér (2001)

289 O radical hidroxila apresenta meia-vida curta e dificilmente é sequestrado *in*
290 *vivo*, caracterizando o ROS mais prejudicial ao organismo, formado por dois
291 mecanismos: hemólise da água por exposição à radicais ionizantes do superóxido e
292 reação do peróxido com metais de transição (HALLIWELL et al, 1992). Nas
293 biomoléculas desencadeia a peroxidação lipídica, atuando na retirada do hidrogênio nos
294 ácidos graxos polissaturados (NORDBERG e ARNÉR, 2001; ANDRADE et al., 2010).

295 O ânion superóxido possui baixa reatividade, sendo considerado inativo.
296 Participa na formação do peróxido de hidrogênio, no processo denominado de
297 dismutação, reação do sistema redox onde a molécula é oxidada e reduzida ao mesmo
298 tempo. Sua participação como oxidante é irrelevante quando comparado com os demais.
299 Contudo, fisiologicamente é indispensável na defesa do organismo contra infecções

300 bacterianas, virais e fúngicas (BARBIOR, 1997; HALLIWELL et al, 2000
301 BARREIROS e DAVID, 2006).

302 O peróxido de hidrogênio, precursor do radical hidroxila, tem como principal
303 função, a penetração nas membranas biológicas (HALLIWELL, 1991). No organismo é
304 formado pelo ânion superóxido através da dismutação. O peróxido de hidrogênio é
305 eliminado principalmente pelas células, sendo que a catalase e a glutatona também
306 exercem essa função (HALLIWELL et al, 2000).

307 Os espermatozoides produzem naturalmente os ROS, e essa produção controlada
308 é importante para sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides, tendo influência
309 direta na fertilidade (BILODEU et al, 2000). O'FLAHERTY et al, (2003) em estudos
310 com sêmen bovino, comprovaram que pequenas quantidades de ânion de hidrogênio e
311 peróxido são importantes para capacitação espermática, reação acrossomal,
312 hiperativação da motilidade e ligação dos gametas.

313 Outras funções benéficas é a contribuição para motilidade espermática,
314 estabilidade da bainha mitocondrial, atuando como segundo mensageiro e sinalizadores
315 de moléculas (SCHRECK et al, 1991; JEDRZEJOWSKA et al, 2012). Dados de
316 Lamirande e Gagnon, (1993), em estudo com humanos, evidenciaram a relação entre a
317 capacitação espermática e O_2^- , observando aumento na concentração de O_2^- ocasionando
318 a hiperativação e a capacitação espermática.

319 Beorlegui et al. (1997), em estudos com sêmen bovino, relataram uma
320 correlação entre os ROS e a motilidade espermática. Onde ejaculados com menor
321 motilidade e vigor espermáticos apresentavam maior lipoperoxidação, tendo menor
322 capacidade fecundante, enquanto espermatozoides com maior integridade de
323 membranas plasmáticas tiveram maior capacidade fecundante.

324 Em 1943, John MacLeod observou que espermatozoides incubados em altas
325 tensões de oxigênio apresentaram perda abrupta de motilidade, sugerindo que essa
326 diminuição foi devido à reação do peróxido de hidrogênio (BAKER e AITKEN, 2004).
327 Fisher e Aitken (1997), em estudos em humanos evidenciaram que os ROS são
328 produzidos desde os primeiros estágios de desenvolvimento das células germinativas
329 masculinas. Posteriormente, Aitken (1999), descobriu que estes são responsáveis pela
330 proliferação das células das espermatogônias, na condensação da cromatina do
331 espermatozoide e manutenção do equilíbrio das células germinativas.

332 Um desequilíbrio na formação e eliminação do ROS nos espermatozoides resulta
333 em danos as células espermáticas. Isso ocorre devido à membrana espermática possuir

334 grandes quantidades de ácidos graxos insaturados enquanto que o citoplasma possui
335 pouca quantidade de enzimas capazes de debelar a ação do ROS (JEDRZEJOWSKA et
336 al, 2012), levando ao processo de peroxidação lipídica, resultando na perda de suas
337 funções (CHRISTOVA et al., 2004) e da integridade do DNA (BAUMBER et al.,
338 2003), além de depleção de ATP e perda de motilidade espermática (De LAMIRANDE
339 et al., 1997).

340 Estudos também comprovam que os espermatozoides com comprometimento na
341 sua morfologia e espermatozoides mortos produzem grandes quantidades de ROS
342 (ENGEL et al, 1999). Estudos em humanos comprovam que células imaturas e com
343 resíduos citoplasmáticos produzem maiores quantidades de ROS (GOMEZ et al, 1996;
344 AZIZ et al, 2004).

345 A peroxidação lipídica ocorre quando os ROS abstraem um átomo de hidrogênio
346 das cadeias dos ácidos graxos insaturados, presentes em grande quantidade nos
347 espermatozoides (HALLIWELL e GUITTERIDGE, 1991). As etapas da peroxidação
348 lipídica são divididas em iniciação, propagação e terminação (HALLIWELL e
349 GUTTERIDGE, 1999). Iniciada quando os carbonos reagem com o oxigênio resultando
350 no radical peroxila, tendo como função o sequestro do hidrogênio, levando a uma
351 sequência de oxidação dos ácidos graxos presentes nas membranas (JIALAL e
352 GRUNDY, 1992).

353 Os principais efeitos da peroxidação lipídica no organismo correspondem à
354 perda da funcionalidade da barreira entre o meio extra e intracelular, conseqüentemente,
355 desestabilização das membranas e funcionalidade das células (KUHN e BORCHERT,
356 2002). Nos espermatozoides, a peroxidação lipídica é responsável por injúrias nas
357 membranas plasmáticas, resultando na perda da fluidez, o que dificulta a regulação da
358 entrada de íons responsáveis pela mobilidade do espermatozoide, que por fim, resultará
359 na dificuldade de penetração no oócito (AITKEN e KRAUSZ, 2001). De acordo, com
360 Maia e Bicudo (2009), existe uma correlação positiva entre a peroxidação lipídica,
361 motilidade e morfologia espermática, essa relação pode ser minimizada pelo uso de
362 antioxidantes aos diluentes.

363 *2.4 Antioxidantes*

364 Os antioxidantes são compostos que regulam, removem e minimizam a
365 formação de ROS ou bloqueiam suas ações (SIKKA, 2004; MANEESH e

366 JAYALEKSHMI, 2006), evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de
367 oxidação (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004).

368 Para evitar o estresse oxidativo, a célula possui um sistema de defesa enzimático
369 e não enzimático composto por substâncias de baixo peso molecular, interagindo contra
370 os ROS. Tendo como principal tríade enzimática o superóxido dismutase, catalase e
371 glutathione nas formas, peroxidase e reduzida, além das peroxiredoxinas. Os não
372 enzimáticos incluem: as vitaminas C e E, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas
373 (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999;
374 NORDBERG e ARNÉR, 2001; JEDRZEJOWSKA et al., 2012).

375 O mecanismo de defesa dos antioxidantes corresponde ao processo de
376 prevenção, intercepção e de reparação. A prevenção corresponde à inibição da produção
377 de ROS, enquanto que a intercepção envolve a interrupção da reação em cadeia dos
378 oxidantes e a reparação não é observada nos espermatozoides devido ao carente sistema
379 enzimático (AGARWAL e SALEH, 2002).

380 O superóxido dismutase é responsável pela formação do peróxido de hidrogênio
381 através do processo de dismutação (NORDBERG e ARNÉR, 2001). Estão presentes
382 tanto intra quanto extracelularmente. O intracelular está na forma de superóxido
383 dismutase aderidas aos radicais, cobre ou zinco, localizados principalmente no
384 citoplasma. Já na forma extracelular, o superóxido dismutase ligado ao manganês,
385 encontra-se na mitocôndria (PEKER et al, 1997).

386



388

389 **Figura 2:** Reação de dismutação do radical superóxido. Fonte (adaptado): Nordberg e Arnér, 2001.

391 A catalase é importante na reação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e
392 água. Formada na próstata, estando presente no plasma seminal. Como oxidante evita a
393 formação do radical, hidroxila. Tendo também como função, a capacitação espermática
394 induzida pelo óxido nitroso (LAMIRANDE et al, 1997; NORDBERG e ARNÉR, 2001;
395 ŚCIBIOR e CZEZOT, 2005).



397

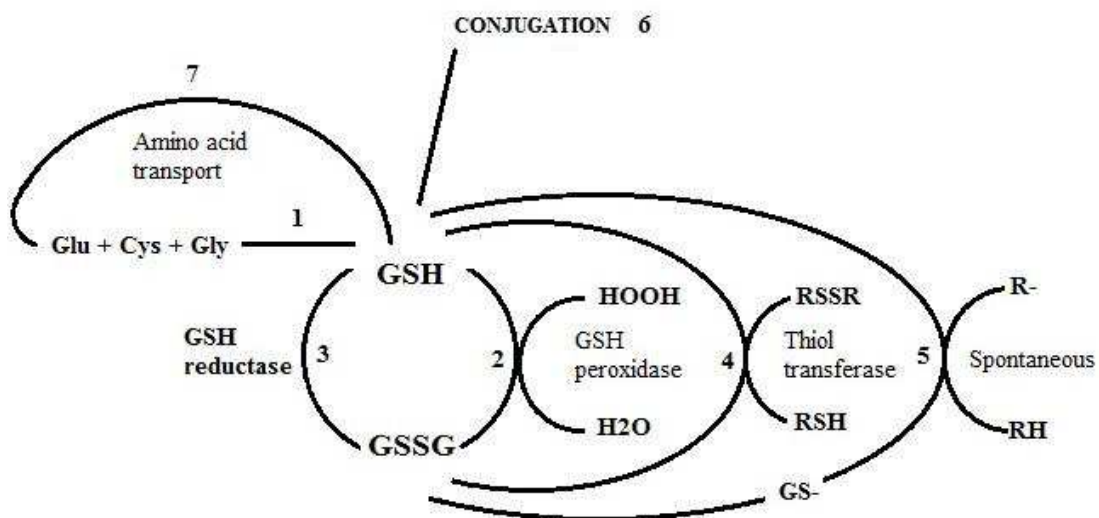
398

398 **Figura 3:** Ação da catalase sobre o peróxido de hidrogênio. Fonte: Nordberg e Arnér, 2001.

399 A glutathione, em mamíferos, está presente pelo menos em quatro formas
 400 (URSINI et al, 1995), enzima selênio – dependente, tendo como precursor o N-acetil-
 401 cisteína que, por sua vez, é a forma estável do aminoácido essencial, cisteína. A
 402 glutathione é caracterizada bioquimicamente como tiol tripeptídeo intracelular mais
 403 abundante, com concentrações variando entre 0,1 a 10 mM, tendo na sua estrutura
 404 molecular, o enxofre (SCHROEDER et al., 1996; LUBERDA, 2005,
 405 JEDRZEJOWSKA et al, 2012).

406 Quanto à função antioxidativa, a glutathione é responsável pela reconstrução dos
 407 grupos tiol (-SH), em proteínas, que podem ser eliminados durante o estresse oxidativo,
 408 como também proteger as membranas celulares da oxidação de lipídios impedindo a
 409 formação de oxigênio livre (LENZI et al, 1994). A atuação da glutathione no organismo
 410 ocorre pela degradação, reduzindo o efeito do peróxido de hidrogênio (FERREIRA e
 411 MATSUBARA, 1997; ALVAREZ e MORAES, 2006). São importantes no
 412 metabolismo das prostaglandinas, leucotrienos, síntese de desoxirribonucleotídeos,
 413 estocagem, transporte de cisteína, função imune e proliferação celular. A catalase e a
 414 glutathione são os principais eliminadores enzimáticos de ROS (LUBERDA, 2005).

415
 416



417
 418
 419

420 **Figura 4:** Metabolismo da glutathione. (2) Eliminação do peróxido de hidrogênio (4) Redução (5) reação
 421 sobre os ROS. Fonte: Brody (1999).

422 A glutathione reduzida é a mais abundante no meio extracelular (MEISTER e
 423 ANDERSON, 1983). A capacidade redutora é fornecida pelo grupamento – SH advindo

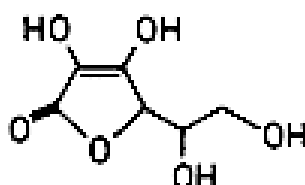
424 da cisteína, tendo como função: proteger a célula contra lesões causadas pelos íons de
425 ferro, oxigênio, radiação e luz ultravioleta, como também exercer o transporte da
426 cisteína, com eliminação dos produtos da peroxidação lipídica. Ainda participa da
427 síntese de DNA, proteínas e algumas prostaglandinas (DENEKE e FARBURG, 1989;
428 SHAN e JONES, 1990; GALLEANO e PUNTARULO, 1995;).

429 Quando o sêmen é submetido ao processo de criopreservação, após a diluição,
430 processo comumente utilizado, ocorre à redução na concentração dos antioxidantes.
431 Nesse processo a glutathione, em bovinos, chega a ser reduzida em até 80%, permitindo
432 o estresse oxidativo (BILODEAU et al., 2000; GADEA et al., 2004; GADEA et al.,
433 2007).

434 A glutathione peroxidase, inicialmente descrita por Mills (1957),
435 bioquimicamente, atua sobre os peróxidos, principalmente o de hidrogênio
436 (NORDBERG e ARNÉR,2001). Nos espermatozoides a glutathione encontra-se em
437 abundância nas mitocôndrias (MARKLUND et al, 1982; PEEKER et al., 1997). Alvarez
438 e Moraes (2004) evidenciaram que a glutathione peroxidase-4 exerce funções
439 importantes nas células espermáticas. Essa enzima age com o peróxido de hidrogênio
440 protegendo as células dos danos oxidativo e ativa a espermátide, atuando como proteína
441 estrutural (VAISBERG et al, 2005; FLOHÉ et al, 2007).

442 Para os espermatozoides a glutathione melhora a motilidade, impede os danos
443 oxidativo ao DNA, entretanto um déficit de glutathione pode levar a instabilidade da peça
444 intermediária dos espermatozoides, resultando em um distúrbio da motilidade
445 espermática (OEDA et al, 1997).

446 O ácido ascórbico ou Vitamina C, no organismo encontra-se na forma de
447 ascorbato, é uma micromolécula solúvel, localizado nos compartimentos aquosos dos
448 tecidos orgânicos (SIES e STHAL, 1995; HALLIWELL, 1999), sendo que a
449 concentração no plasma seminal, é cerca de 10 vezes mais elevada quando comparada
450 com o soro sanguíneo (JEDRZEJOWSKA et al, 2012). No organismo apresenta-se em
451 duas formas: reduzida ou oxidada, na forma de deidroascórbico (WELCH et al, 1995).



452

453 **Figura 5:** Estrutura da Vitamina C. Fonte: SIES e STHAL (1995).

454 Sua principal função antioxidativa constitui na inibição da peroxidação lipídica
455 através da ação dos íons Fe^{2+} e Cu^{1+} (HALLIWELL, 1999), atuando de duas maneiras
456 sobre a peroxidação lipídica: 1 – no soro sanguíneo, na prevenção da reação com os
457 ROS; 2 – restauração, fornecendo hidrogênio (BUETTNER, 1993, FERREIRA e
458 MATSUBARA, 1997). Além de atuar em conjunto com as hidroxilas, H_2O_2 , hipoclorito
459 (ClO^-), OH^- e radical peroxil (OOH^-) (VASCONCELOS et al., 2007).

460 Tem potencial de proteção tanto no citosol quanto nas membranas celulares
461 atacadas pelos ROS. No citosol, atua como antioxidante primário, eliminando-os e nas
462 membranas, reduz o radical tacaferol (SCARPA et al, 1984; MEHLHORN et al, 1989).

463 Nos espermatozoides a vitamina C, presente nos testículos, protege o DNA
464 contra os danos do ROS, contribui na espermatogênese. Tendo uma relação íntima com
465 a glutatona, onde nos testículos pela ação da glutatona reduzida permanece reduzida na
466 forma de desidroascorbato dependente (FRAGA et al, 1991, NAYANATARA et al,
467 2008). Deficiência de vitamina C resulta no estresse oxidativo, que irá afetar a
468 espermatogênese e produção de testosterona (VIJAYPRASAD et al, 2014).

469 No diluidor, o ácido ascórbico pode impactar sobre o desempenho dos
470 espermatozoides, reduzindo os danos celulares através de sua contínua ação radical-
471 eliminação (BECONI, 1993). Em relação ao macho, estudos comprovam que a baixa
472 concentração de Vitamina C no sêmen resulta em diminuição da concentração
473 espermática, aumento de patologias espermáticas e redução de motilidade (DAWSON
474 et al., 1990; LUCK, 1994).

475 Alguns estudos comprovam o efeito benéfico da vitamina sobre o sêmen das
476 diferentes espécies. Asadpour et al. (2011), em estudos com sêmen criopreservado em
477 citrato-gema acrescido de Vitamina C (1 mM/mL) e E (0,1 mM/mL) evidenciaram que
478 houve diminuição da peroxidação lipídica quando comparado com o grupo controle.
479 Zhao et al., (2015), em estudo com sêmen de bovinos da raça Quinchuan criopreservado
480 com acréscimo ao diluidor de vitamina E e C associados, evidenciaram que o grupo
481 tratado com 7 mg/mL de vitamina C e 0,1 UI/mL de vitamina E, apresentou melhores
482 resposta de motilidade espermática, integridade de acrossoma, e atividade de glutatona
483 reduzida e superóxido dismutase. Castilho et al, (2009), em estudo com caprinos,
484 afirmam que o uso de vitamina C preserva as membranas espermáticas e sua
485 viabilidade.

486 Estudos atuais buscam encontrar a concentração ideal dos antioxidantes para as
487 diferentes espécies. No intuito de saber a dose que não apresente efeito tóxico e que a

488 mesma exerça sua função na célula. Poucos trabalhos evidenciam o efeito benéfico da
489 glutathiona associada com a vitamina C, principalmente na espécie bovina.

490 Recentemente, Giaretta et al, (2015), evidenciou o efeito positivo da associação
491 da vitamina C e glutathiona, em sêmen de suíno, estes relataram o efeito benéfico da
492 associação da glutathiona e vitamina C (5mM e 100mM, respectivamente) sobre os
493 parâmetros de viabilidade espermática, integridade acrossômica, motilidade espermática
494 e estrutura nucleoproteína.

495

496 3. *Testes funcionais para avaliação espermática*

497 Vários testes são propostos por diversos pesquisadores a fim de avaliar uma
498 determinada parte do espermatozoide e, assim, dá uma visão sobre os acontecimentos
499 que ocorrem durante a fecundação dos oócitos. A avaliação dos parâmetros seminais
500 sugere informações da produção espermática nos testículos, atividade das glândulas
501 acessórias e função no trato reprodutivo (TALWAR e HAYATNAGARKAR, 2015).

502 Nenhum teste isoladamente é capaz de determinar a fertilidade do sêmen.
503 Contudo, várias características podem avaliar a sua potencialidade (ARRUDA, 2000;
504 ARRUDA et al., 2004). Os testes laboratoriais usualmente utilizados para determinar a
505 fertilidade seminal são: motilidade espermática, vigor, concentrações e morfologia
506 espermáticas, segundo o proposto pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
507 (ARRUDA et al., 2004).

508 Contudo, essas técnicas clássicas de avaliação seminal são ditas como
509 subjetivas. Assim, fazendo-se necessárias técnicas que diminuam a imprecisão. Partindo
510 desse pressuposto, várias tecnologias foram desenvolvidas, dentre elas se podem citar: a
511 avaliação computadorizada do sêmen, o uso de sondas fluorescentes por microscopia de
512 epifluorescência para avaliação das membranas plasmáticas, avaliação de estresse
513 oxidativo, uso de citometria de fluxo, avaliação da morfologia espermática por
514 microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC), dentre outras (ARRUDA,
515 2000; ARRUDA et al., 2004).

516 A avaliação computadorizada do sêmen (CASA) já é bastante difundida
517 (VERSTEGEN et al, 2000). O primeiro sistema foi desenvolvido em 1992, que avaliava
518 os movimentos espermáticos, fornecendo as percentagens dos móveis, velocidade e
519 percentagem dos progressivos (IGUER- OUADA e VERSTEGEN, 2001). O CASA,
520 resumidamente, tem como função digitalizar imagens dos espermatozoides em campos

521 distintos, analisando a cinética individual das células e valores médios da população
522 total. Quanto à cinética, pelo CASA, é possível avaliar a trajetória dos espermatozoides.
523 E ao final, esses dados são capazes de precisar o exato movimento de cada
524 espermatozoide (AMANN e KATZ, 2004).

525 A citometria de fluxo foi desenvolvida primeiramente por Moldavan em 1934,
526 era constituída por um tubo capilar com detector fotoelétrico por onde passavam as
527 células coradas. Mais tarde, Kielland em 1941, desenvolveu outro aparelho baseado nos
528 dados do Moldavan (BERTHO, 2001), seguido de vários outros pesquisadores que
529 aperfeiçoaram o equipamento até os padrões de hoje. A citometria permite a
530 quantificação rápida e sistemática dos espermatozoides (MELAMED et al., 1979),
531 sendo capaz de avaliar até 10.000 espermatozoides por minuto (ARRUDA, 2000).

532 A estrutura espermática pode ser avaliada por diferentes técnicas (ARRUDA et
533 al, 2015), tais como: microscopia óptica com ou sem coloração, por microscopia de
534 contraste de fase ou por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC),
535 objetivando detectar os espermatozoides morfológicamente normais (GALLEGO,
536 2010).

537 Atualmente a microscopia óptica de fluorescência é amplamente utilizada devido
538 a sua especificidade e relativa facilidade (MOREIRA e LINS, 2010). Associado a essa
539 técnica há as sondas fluorescentes que têm como objetivo, avaliar a integridade e
540 funcionamento das células espermáticas (CELEGHINI et al., 2007). O desenvolvimento
541 dessa técnica de coloração com fluorocromos permitiu avaliar a integridade das
542 membranas, com uso de sondas isoladamente ou combinadas (JANUSKAUSKAS e
543 ZILINSKAS, 2002; GILLAN et al., 2005).

544 Usualmente as sondas utilizadas para determinar a integridade das membranas
545 plasmáticas são Iodeto de propídeo (GRANER et al., 1986), Hoechst 33342 e 33258
546 (CASEY et al., 1993), isotiocionato de fluoresceína conjugado com o PSA – FITC –
547 PSA (GRAHAM et al., 1990) e iodeto de tetracloro –
548 tetraetilbenzimidazonilcarbonianina - JC – 1 (GARNER et al., 1997). Além dessas,
549 outras sondas também podem ser utilizadas como SYBR-14 (THOMAS et al., 1998),
550 Rhodamine 123 (REERS et al., 1991), CMXRos (WOJCIKET et al., 2000) e
551 Mitotracker green FM (GARNER et al., 1995).

552 A integridade da membrana plasmática pode ser avaliada pelo Iodeto de
553 propídeo que se liga ao DNA das células mortas (STANDERHOLEN et al., 2014). As
554 células com membranas plasmáticas lesadas são coradas de vermelho (GARNER et al,

555 1996). As sondas Hoechst 33342 e 33258, com afinidade ao DNA, são classificadas
556 como bis – benzimidazoles são solúveis em água e possuem baixa toxicidade, sendo
557 células-dependente. Contudo, a H33258 tem menor permeabilidade na membrana.
558 Assim, para estudos com espermatozoides a hoechst de eleição é a 33342, que se liga ao
559 DNA, corando o núcleo de azul (CASEY et al., 1993; JANUSKAUSKAS e
560 ZILINSKAS, 2002).

561 Para avaliação da integridade acrossomal há duas categorias de sondas. A
562 primeira detecta elementos intracelulares acoplados ao acrossoma, a exemplo temos a
563 lecitinas e anticorpos contra antígenos presente no acrossoma, sendo que lecitinas são
564 mais usuais, capazes de se ligar a matriz acrossomal ou a membrana externa. Dentro
565 dessa categoria, destaca-se a sonda fluorescente FITC, sendo esta conjugada ao PSA
566 (*Pisum sativum aglutinina*), utilizada para determinar a viabilidade e integridade do
567 acrossoma de espermatozoides *in natura* ou criopreservados. Em espermatozoides
568 danificados, o conjugado cora as células em verde-amarelado (CROSS et al., 1986;
569 FARLIN et al., 1992; MEIZEL, 1989). A segunda categoria das sondas é a
570 clortetraciclina e os anticorpos contra antígenos acrossomais externos, sendo menos
571 utilizada rotineiramente (CROSS et al., 1986).

572 Para a avaliação do potencial mitocondrial são utilizadas algumas sondas, como:
573 Rhodamine 123 (REERS et al., 1991), MITO (SILVA et al., 2009) e, em destaque, o
574 iodeto de tetacloro – tetraetilbenzimidazonilcarbonianina – JC-1 (GARNER et al.,
575 1997). O JC-1 apresenta baixa toxicidade, condições ideais de solubilidade, como
576 também características fluorescentes (SMILEY et al., 1991). Segundo Arruda et al.
577 (2007) para penetração e emissão da fluorescência do JC-1 é necessário que a
578 mitocôndria esteja altamente negativa, podendo emitir a coloração verde ou vermelha,
579 essa variação depende da concentração final da sonda, onde em altas concentrações
580 emite coloração vermelha e em baixa concentração emite coloração verde.

581 Vários estudos demonstraram a eficácia da associação de sondas fluorescentes
582 (Garner e Johnson, 1995; Harrison e Vickers, 1990; Cansey et al., 1993), onde esta
583 associação permite a avaliação de várias estruturas das células espermáticas (ARRUDA
584 et al, 2007).

585 Celeghini et al. (2007) em estudo buscaram validar uma técnica de fácil
586 execução e alta repetibilidade para integridade das membranas acrossomal, plasmática e
587 mitocondrial. Foram testados quatro protocolos de sondas em sêmen bovino. O primeiro
588 grupo avaliou as sondas PI, FITC-PSA e R123; o segundo grupo as sondas PI, FITC-

589 PSA e MITO; o terceiro grupo as sondas PI, H342, FITC- PSA e CMXRos; e, por fim,
590 as sondas PI, H342, FITC-PSA e JC-1. Dentre os protocolos o que apresentou melhor
591 resposta foi o conjugado de PI, H342, FITC-PSA e JC-1, pois segundo o autor é
592 possível separar de maneira mais precisa as populações espermáticas com alto e baixo
593 potencial de membrana mitocondrial. Em estudo similar Andrade et al. (2007),
594 validaram a técnica de coloração tripla em sêmen suíno (PI, H342, FITC-PSA), tendo
595 como conclusão que a tripla coloração é eficiente e prática para o sêmen suíno. Vários
596 outros estudos, utilizando diferentes espécies, comprovam a eficácia e praticidade dessa
597 técnica: galo (CELEGHINI et al, 2007), carneiros (CELEGHINI et al, 2010), macaco
598 (ALMEIDA et al., 2012), dentre outras.

599

600 *3.1 Testes para estresse oxidativo*

601 Vários estudos foram realizados na tentativa de determinar um parâmetro do
602 estresse oxidativo, onde possam quantificar com confiabilidade o efeito desse processo
603 sobre a infertilidade (RODRIGUES, 2009). Os ROS podem ser quantificados por
604 citometria de fluxo, quimiluminescência, espectrofotometria, dosagens
605 imunocitoquímica e enzimática (AITKEN et al., 2013). Existem também testes que
606 mensuram de forma indireta a produção das espécies reativas (TBARS), como por
607 exemplo, método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, sendo este proposto
608 desde 1978 por Buege e Aust, sendo amplamente utilizada (LIMA e ABDALLA, 2001).

609 O TBARS quantifica o estresse oxidativo de forma indireta a partir de dois
610 aspectos: (a) pela quantidade de hidroperóxidos, resultante da peroxidação lipídica; (b)
611 capacidade dos espermatozoides pela ação dos antioxidantes na quebra da reação ou
612 pela redução dos hidroperóxidos lipídicos e hidroxíácidos estáveis (AITKEN et al.,
613 1993). Apesar da sua praticidade, o TBARS é inespecífico. Pois, muitas outras
614 substâncias que ocorrem em materiais biológicos também podem reagir com o TBARS
615 (JANERO, 1990; LIMA e ABDALLA, 2001), além de não diferenciar células vivas de
616 mortas, como também não determinam a percentagem de células vivas com peroxidação
617 lipídica (PARTYKA et al, 2011).

618 Assim, novas metodologias estão sendo propostas para mensuração do estresse
619 oxidativo. Dentre essas, há o uso de sondas fluorescentes, como por exemplo, a sonda
620 C11-BODIPY581/591[®]. Brouwers e Gadella, (2003), evidenciaram que esta sonda é um
621 análogo dos ácidos graxos poli-insaturados presente nas membranas plasmáticas, sendo

622 extremamente eficaz, de forma indireta, para mensuração da peroxidação lipídica.
623 Quando exposto aos ROS, na presença de fluorescência, muda irreversivelmente de
624 vermelho para verde (PAP et al, 1999; BROUWERS e GADELLA, 2003). Contudo,
625 avaliação da BODIPY só pode ser realizada por citometria de fluxo (PAP et al, 1999),
626 inviabilizando o uso em grande escala.

627 Na busca por métodos alternativos de fácil execução e leitura (ALVES et al,
628 2015), pesquisas propuseram o uso da sonda fluorescente CellRox Deep Red® para
629 detecção do estresse oxidativo, sendo esta mensurada pela microscopia de fluorescência,
630 como também na citometria de fluxo, podendo ser conservada em formaldeído para
631 posterior análise (LIFETECHNOLOGIES, 2015; GRINBERG et al., 2013). O CellRox
632 mensura a quantidade de ROS presente no citoplasma, na ausência, fica reduzido e não
633 emite fluorescência (ALVES, 2015). Segundo Grinberg et al. (2013) é capaz de
634 detectar o radical hidroxila e o superóxido, e, frente ao estresse oxidativo, esta sonda é
635 oxidada (GRINBERG et al., 2012).

636 Alves et al. (2015), em estudo com ovinos, validaram a técnica para mensuração
637 do estresse oxidativo em sêmen de ovinos, afirmando que a sonda CellRox® é eficiente
638 para detecção dos ROS para espécie ovina. Contudo, novos estudos são necessários para
639 prever a eficácia da sonda nas demais espécies.

640 4. Produção *in vitro* e estresse oxidativo

641 Produção *in vitro* (PIV) é uma biotecnologia amplamente difundida, que busca o
642 melhoramento genético dos rebanhos, preservação da saúde animal e é utilizada como
643 ferramenta para o entendimento dos mecanismos fisiológicos que ocorrem no trato
644 reprodutivo na tentativa de aumentar sua eficiência (GOTTARDI e MIGOTI, 2009). O
645 Brasil é considerado um dos maiores produtores de embriões FIV, tendo 85% do
646 mercado mundial, na região Centro-Oeste e Sudeste concentram-se a maior produção,
647 enquanto que a região Nordeste apresentou um crescimento de 13 %, com destaque aos
648 Estados de Alagoas, Bahia e Maranhão, com expressividade para a raça Nelore (SILVA,
649 2011b).

650 Em 2013 foram produzidos aproximadamente 416.972 embriões bovinos no
651 Brasil, desses 366.517 produzidos *in vitro*, esses resultados foram assegurados com a
652 utilização e otimização dos protocolos de PIV nos laboratórios associados a maiores
653 critérios de escolha nas doadoras (SBTE, 2015). Entretanto, a PIV quando comparada
654 com a produção *in vivo* apresenta eficiência, relativamente, baixa. E essa baixa resposta

655 é oriunda da qualidade dos oócitos, das condições dos sistemas de maturação e cultivo
656 *in vitro* (KRISHER, 2004; CROCOMO et al., 2012), como também os ROS formados
657 durante o processo da PIV, sendo considerado com uma das principais causas da baixa
658 porcentagem de embriões PIV (DALVIT et al., 2005).

659 As espécies reativas de oxigênio causam danos para ambos os gametas, como
660 também ao desenvolvimento dos embriões produzidos fisiologicamente, como também
661 *in vitro*, acarretando prejuízos na produção de embriões (BORGES, 2008), sendo estes
662 susceptíveis aos danos oxidativos, pois seus mecanismos de defesa são insuficientes
663 para proteger estrutura celular frente ao ataque dos ROS (AITKEN et al., 1993).

664 Anteriormente, acreditava-se que os ROS eram formados, basicamente, pela alta
665 tensão de oxigênio presente durante o desenvolvimento *in vitro*, contudo, estudos
666 demonstram que estes podem ser originados pelo metabolismo oxidativo normal na
667 célula devido a um desequilíbrio do potencial redox intracelular e o alto nível de ROS,
668 desencadeando a peroxidação lipídica pela atuação do peróxido de hidrogênio, que leva
669 a modificações de proteínas e danos de DNA, o que podem afetar a maturação dos
670 oócitos e o desenvolvimento dos embriões (CHATTERJEE et al., 2001; MERTON et
671 al., 2013).

672 Há evidências que os ROS podem ser formados devido à ausência da proteção
673 materna dos antioxidantes, exposição a luz, calor e excesso de manuseio (CROCOMO
674 et al., 2012).

675 O sêmen também pode contribuir para a formação do ROS durante a PIV
676 (GUERIN et al., 2001), assim a Fertilização *in vitro* (FIV) tem grande relevância para a
677 taxa de embriões produzidos. Usualmente o sêmen utilizado durante essa etapa é
678 submetido ao processo de criopreservação, que é responsável por lesões deletérias,
679 podendo promover a peroxidação lipídica (BORGES, 2008).

680 Fisiologicamente, no sistema reprodutor da fêmea, macrófagos, neutrófilos e
681 células epiteliais produzem naturalmente os ROS, especialmente durante a ovulação,
682 atuando sobre a lise dos folículos (TAMURA et al, 2012), atuando também como
683 segundos mensageiros que modulam genes responsáveis pela maturação oocitária
684 (DROGE, 2002; HENSLEY et al., 2000), participando também da gametogênese e
685 esteroidogênese. Ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais
686 hidroxila (OH^\cdot), são as principais espécies reativas formadas pelo processo de quebra da
687 molécula de ATP (FEUGANG et al., 2004). Para manter o equilíbrio na formação dos

688 ROS, no líquido folicular, estão presentes os antioxidantes que neutralizam os ROS,
689 evitando o estresse oxidativo (LIVINGSTON et al., 2009).

690 Contudo, durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* não possuem um
691 sistema que controle e neutralize os ROS formados, pois durante o cultivo os níveis de
692 ROS se elevam, ocasionando a perda no desenvolvimento dos embriões e,
693 conseqüentemente, diminuição na taxa de fertilidade (De MATOS et al., 2002). Com
694 base nessas informações, antioxidantes estão sendo testados na tentativa de diminuir o
695 efeito dos ROS sobre os desenvolvimentos embrionários durante a PIV nas diferentes
696 etapas, em destaque a Glutathione e a vitamina C.

697 A Glutathione, antioxidante do tipo tiol selênio dependente (SCHROEDER et al.,
698 1996), está diretamente relacionada com o desenvolvimento embrionário e oocitário,
699 tanto *in vitro* como *in vivo* (LUBERDA, 2005). Esse tiol exerce a função de proteção do
700 DNA, transporte de aminoácidos, síntese de proteínas, regulador da maturação através
701 da quebra vesícula germinativa, contribui para a expansão das células do *cumulus* e
702 formação do pró – núcleo durante a fecundação (BUCCIONE et al., 1990; WHITAKER
703 e KNIGHT, 2004) e *in vitro* atua sobre o peróxido de hidrogênio, culminando com o
704 equilíbrio do sistema redox, diminuindo a apoptose das células embrionárias (De
705 MATOS e FURNUS, 2000).

706 *In vivo*, a síntese da glutathione é realizada pelas enzimas glutamato, glicina e
707 cisteína, sendo sintetizada pelo oócito e embrião no estágio de 8-16 células (De
708 MATOS e FURNUS, 2000), enquanto que *in vitro* a formação desse tiol depende da
709 disponibilidade de aminoácidos precursores presentes nos meios, sendo encontrados
710 principalmente nos meios de MIV (De MATOS et al. 1995). Contudo, em uma hora de
711 cultivo a cisteína é oxidada a cistina, ficando indisponível para as células e prejudicando
712 a síntese de GSH intracelular (SAGARA et al., 1993) e a quantidade dessa enzima nos
713 meios é relativamente baixa, cerca de 0,6 µM (WOLF, 2005). Enquanto, que no cultivo
714 *in vitro*, o meio utilizado, SOF, não contém cisteína em sua composição, ficando a
715 célula na dependência da produção de GSH pelo embrião (DELEUZE e GOUDET,
716 2010).

717 A vitamina C, antioxidante hidrossolúvel, presente no ovário, pode ser
718 encontrada no oócito e nas células da granulosa (THOMAS et al., 2001). Atuará
719 juntamente com a glutathione sobre o peróxido de hidrogênio (NORDBERG e ARNÉR,
720 2001), exercendo a função de proteção do DNA, reparação do aminoácido oxidado,
721 além de participar da produção dos hormônios esteroides e inibição da apoptose das

722 células da granulosa (TILLY & TILLY, 1995; CADENAS et al., 1994). Quanto ao seu
723 uso *in vitro*, há controvérsia na resposta. FERRO et al. (2009) relataram efeito benéfico
724 da vitamina C durante CIV, obtendo melhores taxas de embriões, diferente do
725 encontrado por Olson e Seidel (2000) nas mesmas condições experimentais. Esses
726 autores associaram a resposta da vitamina C sobre os íons Fe⁺ impedindo a peroxidação
727 lipídica.

728 Quanto ao acréscimo de antioxidantes durante a criopreservação do sêmen sobre
729 a taxa de embriões, poucos dados na literatura são relatados, como por exemplo em
730 estudo com sêmen de bovinos por Borges (2008) e Almeida (2013). Segundo Borges
731 (2008), o uso de antioxidantes durante o congelamento do sêmen reduz os níveis do
732 ROS, evitando a peroxidação lipídica preservando as características espermáticas e,
733 consequentemente, as taxas de clivagem e blastocistos.

734

735 **5 Hipótese**

736 A adição de antioxidantes ao sêmen bovino durante a criopreservação eleva a
737 motilidade espermática e reduz os níveis de danos estruturais, melhorando os
738 parâmetros do sêmen pós-criopreservação, além de aumentar a taxa de oócitos
739 fecundados *in vitro*.

740 **6 Objetivo Geral**

741 Avaliar a condição das células espermáticas bovinas, a partir de testes
742 complementares e da fecundação *in vitro*, após criopreservação utilizando diluidores
743 com adição de antioxidantes.

744

745 **6.1 Objetivos Específicos**

- 746 • Avaliar o efeito de dois antioxidantes: Glutathione reduzida, Vitamina C e
747 sua associação, sobre a motilidade espermática e o vigor de
748 espermatozoides bovinos, teste de termorresistência rápido e percentual de
749 células vivas pelo teste de eosina e nigrosina;
- 750 • Determinar a viabilidade espermática após criopreservação com adição da
751 Glutathione reduzida, Vitamina C e sua associação através dos testes de
752 integridade de membranas plasmática e acrossomal, a partir do uso de
753 sondas fluorescentes;

- 754 • Avaliar morfológicamente o sêmen pós-criopreservação pela microscopia
755 diferencial (DIC);
756 • Avaliar o estresse oxidativo pela sonda CellRox;
757 • Avaliar o efeito da adição de antioxidante ao diluidor na fecundação *in*
758 *vitro*

759 7 *Material e Métodos*

760 O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do
761 Acre, sob número de registro: 50/2015.

762 7.1 *Local*

763 Foram utilizados nove touros da raça Nelore, com média de 2 anos de idade,
764 previamente selecionados por exame andrológico. As colheitas foram feitas através de
765 eletroejaculador, segundo o recomendado para espécie bovina, avaliando-se
766 posteriormente o sêmen quanto as suas características, segundo o Colégio Brasileiro de
767 Reprodução Animal (HENRY e NEVES, 1998).

768 7.2 *Diluidores para a criopreservação de sêmen*

769 No experimento foi utilizado o diluidor, Tris-gema (Anexo 1). Após a colheita
770 do sêmen, seguido da avaliação prévia, cada ejaculado foi dividido em quatro frações
771 iguais, sendo cada fração diluída na proporção de 1:1, com o diluente controle, Tris-
772 Gema. Os antioxidantes foram acrescentados na diluição final, segundo Borges (2003).

773 Tratamentos:

1. **Grupo Controle** – sêmen e diluidor Tris – gema
2. **Grupo Vitamina:** diluidor Tris - gema acrescido de vitamina C (SIGMA – A5960); 2,5mM/mL
3. **Grupo Glutaciona:** diluidor Tris – gema acrescido de Glutaciona reduzida (SIGMA – G4251); 2,5 mM/mL
4. **Grupo Associado:** diluidor Tris – gema acrescido de Glutaciona reduzida e vitamina C; 1,25 mM/mL/ cada

774 *7.3 Criopreservação e descongelamento*

775 Após as diluições, de acordo com cada grupo, o sêmen foi envasado em palhetas
776 francesas de 0,25 mL e congelados no equipamento programável, TK 3000[®]. Utilizou-
777 se a curva de congelação para bovino SII, em seguida foram acondicionadas em portas
778 palhetas, seguindo a curva de resfriamento até atingir 5 °C. Ao atingir os 5 °C o sêmen
779 permaneceu em tempo de equilíbrio de 2 horas. Em seguida, o porta - palhetas foi
780 transferido para caixa térmica contendo nitrogênio líquido permanecendo até a
781 temperatura de -120 °C em uma curva de -15 °C/ minuto. Ao chegar a essa temperatura
782 as palhetas foram retiradas do porta-palhetas e submergidas no nitrogênio líquido a -196
783 °C. As palhetas foram organizadas em raques e armazenadas em botijões criogênicos.
784 Para as avaliações subsequentes, as amostras foram descongeladas em banho maria, a
785 37 °C por 30 segundos.

786 *7. 4 Testes espermáticos*

787 *7.4.1 Motilidade e vigor espermáticos pós-criopreservação*

788 Para motilidade e vigor espermático foram descongeladas as palhetas francesas
789 em banho – maria a 37 °C, sendo depositado 10 µL de sêmen em lâmina pré aquecida,
790 sob microscopia de contraste de fase (Microscópio de Epifluorescência marca Nikon,
791 Modelo Eclipse 80i), sendo avaliada por único operador. Ressalta-se que não foi
792 possível avaliação em CASA devido à grande presença de grumos no diluidor, tornando
793 a avaliação imprecisa.

794 *7.5.2 Teste de longevidade (Teste de termorresistência rápida - TTR)*

795 O TTR foi realizado descongelando as palhetas em banho-maria, primeiramente
796 a 37 °C para avaliação da motilidade inicial, sendo as palhetas, logo depois, mantidas
797 em banho-maria, a temperatura de 45 °C, durante 30 minutos, sendo avaliada a
798 motilidade progressiva a cada 10 minutos, com objetivo de determinar a resistência dos
799 espermatozoides às condições impostas.

800 *7.4.3 Eosina e nigrosina*

801 Para a quantificação das células vivas as palhetas foram descongeladas em
802 banho – maria a 37 °C para motilidade inicial, depois 10 µL de sêmen foram alíquotados

803 sobre lâmina e lamínula e 10 µL do corante eosina e nigrosina foram depositados sobre
804 o sêmen e homogeneizado para posterior esfregaço. Após 10 minutos de secagem da
805 lâmina, foi realizada a leitura em microscópio com aumento de 100x sobre óleo de
806 imersão.

807 *7.5 Teste de avaliação das membranas plasmáticas pós-criopreservação*

808 As avaliações foram realizadas na Universidade de São Paulo, campus
809 Pirassununga. Para esta análise foram colocados em um microtubo 150 µL de uma
810 amostra do sêmen, por partida e tratamento, diluída em meio TALP *sperm* (Anexo 2),
811 na concentração de 20×10^6 espermatozoides/mL, adicionados 3 µL de PI (0,5 mg/mL
812 em DPBS anexo 2), 6 µL de JC-1 (153 µM em DMSO, anexo 2) e 50 µL de FITC-PSA
813 (100 µg/mL em DPBS, anexo 2). As amostras foram incubada por 8 minutos a 37 °C.
814 Após a incubação uma gota (4 µL) desta foi utilizada para o preparo da câmara úmida,
815 entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37 °C) e a leitura foi realizada sob microscopia
816 de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência marca Nikon, Modelo Eclipse
817 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C
818 (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e
819 emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm), com
820 aumento de 1.000x. Foram contadas 200 células, classificadas em oito categorias de
821 acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, conforme os descrito por Celeghini
822 et al. (2008), e os resultados expressos em porcentagem.

823 *7.6 Estresse oxidativo pós-criopreservação*

824 O estresse oxidativo foi avaliado através da sonda fluorescente CellROX™
825 Reagente Deep Red (anexo 2). A partir da diluição do sêmen no meio TALP *sperm*, foi
826 aliquotado 50 µL e acrescido 1 µL de H3342 e 2µL de CellROX. A amostra foi
827 incubada por 30 minutos a 37 °C. Após a incubação foi centrifugado por 5 minutos a
828 2000 xg. Após a centrifugação uma gota (4 µL) desta foi utilizada para o preparo da
829 câmara úmida, entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37 °C) e a leitura foi realizada
830 sob microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência marca Nikon,
831 Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos
832 UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495
833 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm),

834 com aumento de 1.000x, segundo o proposto por Alves et al. (2015), adaptado para
835 espécie bovina. Foram contadas 200 células e os resultados expressos em porcentagem.

836 7.7 Morfologia espermática pós-criopreservação

837 A morfologia espermática foi realizada em microscopia de contraste de interferência
838 diferencial (DIC), sob lâmina e lamínula em aumento de 1000x. Foram contadas 200
839 células e os resultados expressos em porcentagem.

840 7.8 Fecundação *in vitro*

841 A capacidade fecundante dos espermatozoides foi avaliada pela fecundação *in*
842 *vitro*. Foram realizadas sete repetições. Para tanto, oócitos oriundos de ovários de
843 abatedouro, localizado no polo industrial da cidade de São Luís-MA, foram
844 transportados em garrafa térmica contendo solução salina a 0,9 % de NaCl na
845 temperatura de 37° C. No laboratório foram lavados com a mesma solução pré-
846 aquecida, em seguida sendo aspirados os folículos entre 2 e 8 mm, com seringas de 3
847 mL e agulha 21G. O líquido aspirado foi depositado em tubo cônico de 15 mL e
848 mantido em banho-maria por 10 minutos para a sedimentação.

849 Após a sedimentação, o líquido folicular foi recuperado com auxílio de uma
850 pipeta Pauster e depositado em placa de petri, contendo DPBS aquecido e líquido
851 folicular, com posterior classificação dos oócitos em lupa estereoscópica, modelo
852 NOVA LBX-20 com aumento de 2-3 x 100, em Grau I, II, III e IV, de acordo com
853 Gonçalves et al. (2008). Para maturação *in vitro* (MIV) foram utilizados apenas os
854 oócitos de melhor qualidade (I e II).

855 O meio de maturação foi constituído por meio de maturação Biodux®. Os oócitos
856 foram separados em quatro gotas de 100 µL, contendo a mesma quantidade de oócitos
857 por gota recobertos por óleo mineral, e maturados em incubadora com 5% de CO₂, com
858 umidade saturada e temperatura de 38,5 °C durante 22 a 24 horas. Após as 24 horas foi
859 verificada a maturação oocitária em lupa estereoscópica modelo NOVA LBX-20 com
860 aumento de 2-3 x 100, observando a expansão das células do *cumulus*, o enegrecimento
861 das mesmas e a característica do ooplasma (WURTH e KRIUP, 1992). Os oócitos
862 maturados foram submetidos ao processo de fecundação *in vitro*.

863 Após a maturação, os oócitos foram lavados por três vezes em passagens no
864 meio de fecundação Biodux®, contendo 20µL de heparina (Biodux®) e 40µL de PHE
865 (penicilina, hipotaurina e epinefrina - Biodux®). A preparação espermática foi obtida de

866 um pool de sêmen congelado correspondente a cada tratamento de partida única onde
867 três animais foram escolhidos, segundo os seguintes critérios: motilidade mínima de
868 30% pós-descongelamento e sobrevivência pós – Percoll (Biodux®).

869 A separação espermática foi realizada em gradiente de Percoll (Biodux®),
870 constituindo – se de 400 µL de Percoll a 90% mais 400 µL de Percoll a 45% e 400 µL
871 do sêmen de cada tratamento depositado em eppendorff. Em seguida, levou-se à
872 centrífuga em 3.000 rotações por minuto por 10 minutos. Transcorrido o tempo, foi
873 retirado o pellete, este transferido para 700µL de meio de fecundação da Biodux®. Em
874 seguida, foi levado novamente para a centrífuga por cinco minutos em rotação de 3.000
875 por minuto. Retirou-se o sobrenadante, ficando com o pellet. Uma alíquota de 5 µL foi
876 retirada para os cálculos de concentração e determinação do volume da dose
877 inseminante.

878 Posteriormente, foi adicionado 2 µL por tratamento em cada gota. A incubação
879 foi procedida em condição idêntica à da maturação, durante um período de 18 horas
880 (38,5 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂). O percentual de fertilização *in vitro* foi
881 determinada avaliando o número de embriões divididos em dois ou mais blastômeros,
882 segundo Dalvit et al. (2005).

883 Os zigotos fertilizados foram transferidos para placa de petri, obedecendo aos
884 tratamentos, com gotas de 100 µL do meio SOF Final Biodux® e incubadas a 38,5 °C
885 em atmosfera úmida com 5% de CO₂, durante oito dias (D-7) de cultivo *in vitro*. E a
886 cada dois dias era realizado o *feeding*, contendo meio SOF Final Biodux®, sendo
887 classificadas as estruturas, segundo a Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões
888 (SBTE).

889 ***8 Análise estatística***

890 As avaliações de biometria testicular, motilidade espermática no momento da
891 coleta, vigor espermático, perímetro escrotal, volume e concentração inicial dos animais
892 foram apresentadas de forma descritiva, utilizando à média e o desvio padrão de cada
893 resposta. O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso, sendo as variáveis
894 paramétricas testadas por ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de Tukey.
895 Todas as variáveis passaram pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Lilliefors.
896 As variáveis que tinham respostas subjetivas ou não entraram na normalidade após
897 transformação foram analisadas como não paramétricas, comparando-se os
898 ranqueamentos pelo teste de Friedamn. As respostas dicotômicas foram avaliadas pelo

899 teste do Exato de Fisher. O intervalo de confiança utilizado foi de 95%. Os dados foram
900 analisados pelo programa BioEstat 5.0.

901 Para produção *in vitro* quantidade de oócitos, maturação *in vitro* e valores de
902 motilidade dos animais utilizados na fecundação *in vitro* foi desenvolvido de forma
903 descritiva. A taxa de fecundação, percentual de embriões, apresentada dentro de cada
904 grupo de óocitos colocados na FIV por tratamento foi avaliada pelo teste do Exato de
905 Fisher. O intervalo de confiança utilizado foi de 95%.

906 **9 Resultados e discussão**

907 **9.1 Avaliações externas e análises prévias**

908 Dados correspondente as avaliações externas e análises prévias dos animais
909 utilizados experimentalmente estão expostos na tabela 1.

910 **Tabela 1.** Média e desvio padrão da biometria testicular e análises prévias dos
911 animais utilizados experimentalmente, São Luís – 2015.

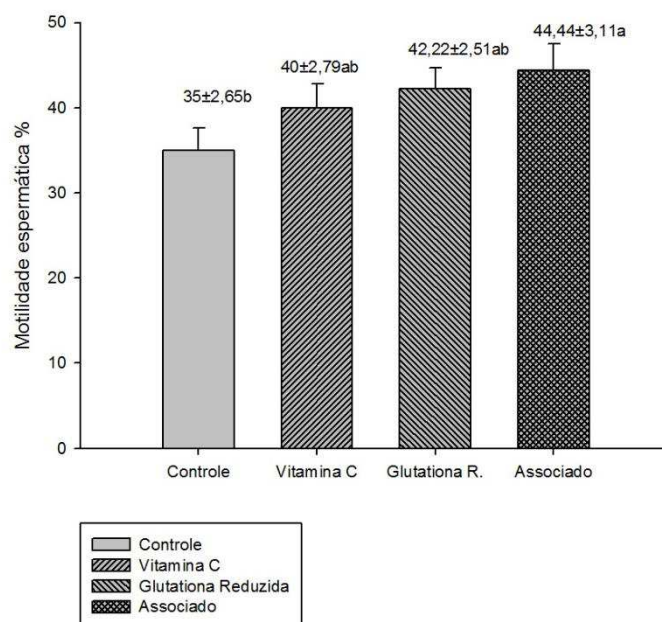
	Médias e desvio padrão
Comprimento testículo direito (cm)	11,57 ± 1,06
Comprimento testículo esquerdo (cm)	11,75 ± 1,11
Largura testículo direito (cm)	7,6 ± 0,97
Largura testículo esquerdo (cm)	7,44 ± 0,76
Motilidade espermática (%)	81,11 ± 3,33
Turbilhonamento	3,33 ± 0,5
Vigor espermático	3 ± 0,0
Concentração espermática (x 10 ⁶ sptz/ml)	429, 55 ± 164,32
Volume (mL)	7, 44 ± 2,96
Perímetro escrotal (cm)	37,3 ± 3,32

912

913 Os valores estão de acordo com as normas do CBRA (HENRY e NEVES, 1998).

914 **9.2 Motilidade e vigor espermáticos pós-criopreservação**

915 As médias e erro padrão para motilidade espermática estão expostos no gráfico
916 1.



917

918 **Gráfico 1:** Médias e erro padrão para motilidade espermática para os animais tratados com Vitamina C,
 919 glutaciona reduzida e associação, São Luís – 2015. Letras distintas diferem pelo teste Exato de Fisher
 920 ($P < 0,05$). $P < 0,05$; CONT – Controle; VIT – Vitamina C; GLUT – Glutaciona reduzida; ASSOC –
 921 Associado.

922

923 A vitamina C apesar de atuar sobre a peroxidação lipídica e nos ROS, na
 924 concentração utilizada observou-se discreto incremento da motilidade espermática.
 925 Contudo, não havendo diferença estatística quando comparado ao grupo controle ($P >$
 926 $0,05$). Esse resultado corrobora com Marques et al. (2002) que não observaram o efeito
 927 favorável da vitamina C (4,5 g/l) quando adicionada isoladamente em sêmen de equino.
 928 No entanto, Hong-Hu et al. (2010), em estudo com sêmen bovino, observaram o efeito
 929 positivo do acréscimo desse antioxidante (4,5 mg/mL) sobre os parâmetros
 930 espermáticos, como motilidade e movimento espermáticos e integridade das
 931 membranas.

932 Esse efeito benéfico da vitamina C é atribuído a ação desse antioxidante sobre a
 933 integridade do axonema e mitocôndrias, como também o seu efeito no sequestro dos
 934 radicais livres para que estes não se liguem ao oxigênio, consequentemente, não ocorra
 935 a formação do ROS (MEMON et al, 2012).

936 Para o grupo glutaciona, que igualmente a vitamina C, atua debelando os ROS e
 937 seus produtos, se evidenciou uma melhora significativa da motilidade espermática em
 938 relação ao controle, apesar de não diferir estatisticamente ($P > 0,05$). Resultados que se
 939 assemelham aos encontrados por Turcer et al. (2010) em sêmen bovino acrescido de
 940 glutaciona na concentração de 0,5 a 2 mM/mL. Essa resposta pode se justificar com base

941 no estudo de Gadea et al. (2004), que afirmam que a glutathione reduzida teria melhor
942 resposta se a mesma fosse adicionada ao sêmen pós – descongelamento, uma vez que
943 esta aumentaria a glutathione intracelular a ser usada pela glutathione peroxidase para
944 evitar danos causados pela peroxidação lipídica, pois durante a criopreservação há
945 diminuição desse antioxidante.

946 Contudo, Ansari et al. (2012), em estudo com búfalos utilizando a concentração de
947 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mM/mL, observaram efeitos significativos frente ao controle, o
948 mesmo observado por Oliveira et al. (2013) em estudo com equinos utilizando a
949 concentração de 2,5 mM/mL que constataram o efeito benéfico da glutathione sobre os
950 parâmetros de motilidade progressiva, corroborando com Ogata et al. (2015) em estudo
951 com sêmen canino acrescido de glutathione utilizando a concentração de 5 mM/mL.
952 Dados que vão de encontro aos resultados aqui apresentados.

953 Essa resposta contraditória dos antioxidantes, avaliados isoladamente, pode ser
954 explicada pela concentração que diferiu dos autores acima, sendo que esta, não foi
955 capaz de neutralizar o efeito do ROS e ou se igualou ao nível basal. Assim, não
956 apresentou diferença no seu acréscimo no diluente, afirmações que corroboram com
957 Baumber et al. (2000) e Satorre et al. (2007).

958 Outros fatores, tais como a diferença entre laboratórios no protocolo de diluição
959 dos antioxidantes e criopreservação das células, o tempo de adição e exposição do
960 sêmen com o antioxidante e a concentração daquele antioxidante para aquela
961 determinada espécie, podem justificar essa variabilidade dos antioxidantes quanto a
962 preservação das células espermáticas (ASADPOUR et al., 2012). Porém, os valores de
963 motilidade espermática estão acima do recomendado pelo CBRA (HENRY e NEVES,
964 1998), com valores mínimos de motilidade espermática de 30% para sêmen pós –
965 descongelamento.

966 Enquanto o grupo associado diferenciou estatisticamente quando comparado ao
967 grupo controle ($P < 0,05$), isto pode ser explicado devido à ação conjunta dos
968 antioxidantes, favorecendo a diminuição do peróxido de hidrogênio. Pois, a diminuição
969 da motilidade espermática associada com este ROS ocorre, principalmente, em
970 diluidores a base de gema de ovo e glicerol, isto pode ocorrer devido a gema de ovo ser
971 uma importante fonte de íons ferro e outros metais (BILODEU et al., 2002), onde estes
972 íons são necessários para o desencadeamento da peroxidação lipídica (BAMBUER, et
973 al., 2000). Fato este corroborado por Giarretta et al. (2015), em estudo com sêmen de
974 suíno, que relataram o efeito benéfico da associação da glutathione reduzida (5mM) e

975 vitamina C (100mM) sobre os parâmetros de viabilidade espermática, integridade
 976 acrossômica, motilidade espermática e estrutura nucleoproteína, com atuação desses
 977 antioxidantes sobre o peróxido de hidrogênio.

978 Quando avaliada a motilidade espermática dentro de tempo pós - descongelação,
 979 não houve diferença estatística entre os tratamentos em relação ao grupo controle
 980 ($P>0,05$), avaliadas pelo teste de termorresistência rápida - TTR (Tabela 2).

981

982 **Tabela 2.** Média e desvio padrão da motilidade espermática dentro de tempo avaliada pelo teste
 983 de termorresistência rápida (TTR), São Luís – 2015.

Tratamento	Motilidade espermática		
	10`	20`	30`
Controle	36,66 ± 10,30	24,44 ± 8,81	2,22 ± 4,40
Vitamina C	43,33 ± 7,90	30,00 ± 10,00	8,88 ± 12,69
Glutathione R	42,77 ± 8,33	31,66 ± 15,81	6,66 ± 8,66
Associação	40,55 ± 9,16	30 ± 11,18	13,33 ± 12,24

984

Não houve diferença estatística ($P>0,05$) quando se compararam as médias pelo teste de Friedman dentro de cada tempo entre tratamentos.

985 Foi observada diminuição da motilidade espermática para todos os grupos tratados
 986 e controle após os 45 minutos de avaliação. Entretanto, o grupo associado apresentou
 987 tendência de preservação da motilidade no terceiro momento de avaliação.

988 Esses resultados diferem do encontrado por Bilodeu et al. (2001), os quais,
 989 trabalhando com sêmen de touros acrescido de glutathione reduzida (0.1, 0.2 e 0.5 mM),
 990 encontraram resultados positivos na incubação desse sêmen na temperatura de 38 °C por
 991 6h concordando com Peixoto et al. (2013), em estudo com sêmen de cães incubados a
 992 37 °C por 60 minutos, suplementados com glutathione na concentração de 2 e 5 mM/mL.
 993 Essa diferença pode ser explicada devido às condições nas quais o sêmen foi incubado
 994 por esses autores mimetizam o estado fisiológico normal, diferindo das condições de
 995 temperatura que o sêmen do presente estudo foi acondicionado.

996 Gonçalves et al. (2011) em estudo com sêmen de búfalos com sêmen
 997 suplementado com vitamina C e pentoxifilina, com a mesma concentração de vitamina
 998 C, 2,5mM, após o TTR, constataram incremento significativo nos parâmetros da
 999 motilidade espermática, diferindo dos dados atuais que corroboram com o estudo de
 1000 Peixoto et al. (2008) que evidenciaram que o acréscimo de vitamina C, isoladamente ou
 1001 em associação com trolox, não favoreceu a manutenção da motilidade espermática
 1002 durante o período de 60 minutos a 37 °C, sugerindo que a vitamina C na concentração a

1003 qual este antioxidante foi utilizado, 600mM/L/cada, não favoreceu a manutenção da
1004 motilidade espermática, e nem tem a capacidade de debelar o efeito dos ROS formados.

1005 Contudo, é esperada uma diminuição da qualidade espermática em relação ao
1006 tempo a qual as palhetas foram descongeladas, Snoeck et al. (2015) também
1007 evidenciaram diminuição dos parâmetros espermáticos em sêmen de ovinos acrescido
1008 de catalase, superóxido dismutase e glutatona reduzida (100 U/mL; 100 U/mL e 5 mM,
1009 respectivamente), após uma hora de avaliação, o mesmo relatado por Peixoto et al.,
1010 (2013), estes observaram que após 45 minutos houve redução dos parâmetros,
1011 motilidade e vigor espermático, em sêmen de cães suplementado com glutatona
1012 reduzida (2 e 5 mM/mL) e trolox (100 e 200 U/mL).

1013 Outro ponto a ser considerado é que a quantidade de antioxidantes no diluente
1014 pode não ter sido suficiente para preservar as características espermáticas, como
1015 também debelar os ROS formados durante o período da avaliação. Pois, é de
1016 conhecimento que espermatozoides mortos, que sofreram apoptose no decorrer do
1017 período da avaliação, e comprometidos fisiologicamente, são potentes produtores de
1018 ROS (ENGEL et al, 1999).

1019 Para a categoria, vigor espermático, não houve diferença significativa ($P>0,05$),
1020 valores apresentados na tabela 3.

1021

1022 **Tabela 3.** Médias e desvios padrão do vigor espermático para os animais tratados com
1023 Vitamina C, glutatona reduzida e associação, São Luís – 2015.

Tratamento	Média e desvio padrão
Controle	2,11 ± 0,33
Vitamina C	2 ± 0,00
Glutaciona reduzida	2 ± 0,00
Associado	2,11 ± 0,33

1024 Não houve diferença estatística ($P>0,05$) quando se comparou as médias pelo teste de Friedman.

1025

1026 O vigor espermático representa a mobilidade do espermatozoide, refletindo o
1027 potencial fecundante e a competência metabólica (CELEGHINI, 2005 e CASTRO,
1028 2010). Contudo, não se observou interferência dos antioxidantes para esta categoria
1029 ($P>0,05$).

1030 Esperava-se que o acréscimo dos antioxidantes no diluidor melhora-se ou
1031 preserva-se o vigor espermático, dados que diferem do encontrado por Monteiro et al.
1032 (2009) em sêmen criopreservado de cães acrescido de vitamina C (50 e 250 μ M) e

1033 glutationa (1 e 5 mM), o vigor espermático manteve-se preservado após 120 minutos,
 1034 sendo influenciado pelo acréscimo dos antioxidantes, o mesmo observado por Marques
 1035 et al. (2002) em sêmen de equino suplementado com vitamina C (4,5 g/L) e
 1036 pentoxifilina (3,5 mM).

1037 Observou-se uma diminuição dos valores espermáticos em relação ao sêmen *in*
 1038 *natura*, estando abaixo do preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal,
 1039 que preconiza valores igual ou superior a 3, pós descongelamento. Contudo, esse
 1040 decréscimo pode ser explicado devido ao consumo de substratos, intracelular e
 1041 extracelular, como também metabolização de ATP durante a criopreservação (KAMP et
 1042 al., 2003).

1043 9.3 Membranas plasmáticas

1044 A porcentagem das membranas plasmáticas e acrossomal (PIAI -
 1045 espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras; PI - integridade de
 1046 membrana plasmática; AI – membrana acrossomal íntegra) foram avaliadas pela técnica
 1047 de tripla coloração (tabela 4).

1048 **Tabela 4.** Médias e desvios padrão (%) da integridade de membranas e integridade de
 1049 acrossoma para os animais tratados com vitamina C, glutaciona reduzida e associação dos
 1050 antioxidantes, São Luís – 2015.

Tratamentos				
%	Controle	Vitamina C	Glutaciona R.	Associado
PIAI	8,0 ± 6,27	8,83 ± 5,53	7,94 ± 7,37	10,16 ± 10,40
PI	8,05 ± 6,24	10,55 ± 7,06	8,27 ± 7,63	10,27 ± 10,33
AI	27,27 ± 11,09	33,94 ± 10,35	32,72 ± 15,61	32,05 ± 14,05

1051 Em coluna; Não houve diferença estatística (P> 0,05) quando se comparou as médias pelo teste de Tukey. PIAI - espermatozoides com membrana
 1052 plasmática e acrossomal íntegras; PI - integridade de membrana plasmática; AI - membrana acrossomal íntegra.

1053 Os resultados para todos os grupos e categorias estão abaixo da normalidade.
 1054 Trabalhos pós – criopreservação com sêmen bovino demonstram percentual de
 1055 integridade das membranas plasmáticas de 33,7 ± 11,4% (ZÚCCARI et al., 2009), 61,3
 1056 ± 14,2% (BERTOZZO e ZÚCCARI, 2009) e 57,00±13,11% (ABUD et al., 2014),
 1057 resultados superiores aos aqui encontrados.

1058 Essa baixa resposta na integridade das membranas plasmáticas pode ser
 1059 justificada pelo estresse que os espermatozoides passaram durante a criopreservação.
 1060 Esse processo, por se só, é responsável pela perda de 50 – 60% de espermatozoides

1061 (WATSON, 2000), os que sobrevivem podem ser lesionados, principalmente, pelo
1062 choque térmico ocorrido durante a fase de refrigeração, que antecede a criopreservação,
1063 resultando em injúrias nas membranas plasmáticas dos espermatozoides (CAMARA et
1064 al, 2011), pois durante esse processo ocorre mudanças na fluidez das membranas
1065 (HOLT, 1990). Outros fatores também podem ter contribuído para tais resultados, como
1066 a qualidade do diluente e seus componentes, que podem ter interferido na leitura,
1067 mascarando a resposta frente à emissão das sondas fluorescentes.

1068 Quando avaliado os antioxidantes sobre a integridade das membranas, não houve
1069 diferença estatística ($P>0,05$). Esperava-se que a suplementação dos antioxidantes,
1070 favorecesse uma proteção as células espermáticas frente aos criodanos, causados,
1071 principalmente, pelo H_2O_2 , pois este em relação aos demais ROS, possui maior
1072 facilidade de atravessar as membranas plasmáticas (BAUMBER et al. 2000),
1073 desestabilizando-as através da lipoperoxidação. Dados na literatura demonstram
1074 resultados contraditórios, e distintos do atual estudo, com o uso de antioxidantes nos
1075 diluentes sobre a cinética e viabilidade espermática.

1076 Snoeck et al. (2015), não observaram efeitos favoráveis da suplementação de
1077 catalase (100 e 200 U/mL), superóxido dismutase (100 e 200 U/mL) e glutathione
1078 reduzida (5 e 10 mM/mL) em sêmen de ovinos criopreservados. O mesmo observado
1079 por Soares et al. (2011), os quais, não encontraram efeito de preservação das células
1080 espermáticas, pós-criopreservação, com sêmen de caprinos suplementados com
1081 glutathione reduzida (2, 5 e 7 mM/mL). Entretanto, o grupo suplementado com 2
1082 mM/mL apresentou maior percentual de células com membrana plasmática íntegra.

1083 Por outro lado, Oliveira et al. (2013), constataram efeito protetor da glutathione
1084 (1, 1,5 e 2,5 mM/mL) na integridade acrossomal em sêmen de equino mantido sobre
1085 refrigeração por 12h corroborando com Asari et al. (2012), estes autores comprovaram o
1086 efeito benéfico da glutathione reduzida (0,5, 1, 1,5 e 2 Mm/mL) sobre a integridade das
1087 membranas plasmáticas. Assim, pode-se afirmar que menores concentrações de
1088 glutathione reduzida, exercem maior proteção as células espermáticas, atuando sobre a
1089 peroxidação lipídica durante a congelação, pois estudo utilizando glutathione em maiores
1090 concentrações observaram diminuição da integridade da motilidade acrossomal e
1091 mitocondrial (SILVA et al., 2011). Bilodeu et al. (2002), afirmam que concentrações
1092 elevadas desse antioxidante em sêmen bovino, alteram a osmolaridade celular,
1093 acarretando em lesões e rupturas das membranas das células espermáticas.

1094 Quanto a suplementação de vitamina C, Michael et al. (2007) em estudo com
1095 sêmen de cães acrescido de vitamina C (1,5 mM/mL), cisteína (1,5 mM/mL), taurina
1096 (0,6 mM/mL), vitamina E (0,3 mM/mL), catalase (300 U/mL) e B16, não verificaram
1097 diferença para a integridade das membranas, sendo o mesmo verificado por Michael et
1098 al (2008), que não observaram diferença na integridade acrossomal ao avaliarem sêmen
1099 de cães suplementados somente com vitamina C em diferentes concentrações (0,1, 0,5,
1100 1 e 2,5). Paudel et al. (2010), já relataram efeito nocivo desse antioxidante,
1101 apresentando um menor percentual de acrossoma íntegros quando utilizaram vitamina C
1102 (10 mM/mL), catalase (200 UI/mL) e clopromazina associado ou não com a vitamina C
1103 (0,1 mM/mL) em sêmen de bovinos.

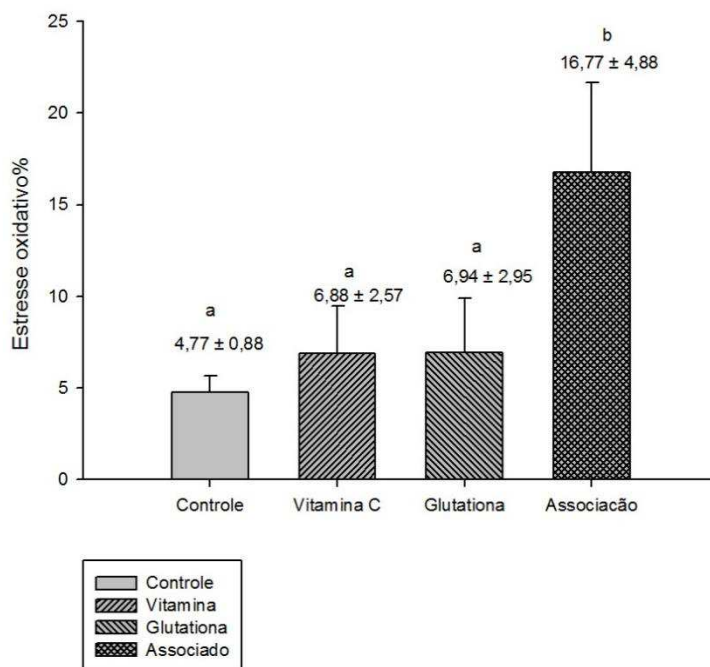
1104 Enquanto que Zhao et al., (2015), demonstraram efeito positivo da vitamina C
1105 (1400 UI/mL) associado com vitamina E (0,12 UI/mL) na preservação do acrossoma
1106 pós – criopreservação, o mesmo atestado por Pessoa et al. (2011) que também
1107 evidenciaram resultados de proteção às células espermáticas, para sêmen de búfalos
1108 suplementados com Vitamina C e pentoxifilina, com $57,6 \pm 5,9\%$ de espermatozoides
1109 íntegros. Justificando-se, pois a vitamina C, produz o tacopherol (BUETTNER e
1110 JURKIEWICZ, 1993), 1993), que inibi e reduz os danos oxidativos, tanto intra quanto
1111 extracelular (PAUDEL et al, 2010; HONG-HU et al., 2010).

1112 O sêmen acrescido de ambos os antioxidantes, apesar da ausência da diferença
1113 estatística foi o que apresentou melhores respostas para a integridade das membranas.
1114 Guiaretta et al. (2015) em estudo com sêmen suíno criopreservado utilizando a
1115 combinação da vitamina C (100 uM/mL) e da glutathione reduzida (5 mM/mL)
1116 evidenciaram efeito positivo da associação desses antioxidantes na integridade
1117 acrossômica, sendo o mesmo avaliado após 240 minutos pós congelamento, e essa
1118 resposta foi atribuída ao efeito dos antioxidantes, primeiramente a glutathione sobre as
1119 pontes de dissulfeto e a ação conjunta dos antioxidantes sobre as nucleoproteínas, como
1120 também protegendo o DNA durante a criopreservação de sêmen e controlando, ambos,
1121 o efeito do peróxido de hidrogênio.

1122 Assim, efeitos negativos e positivos podem ser encontrados dependendo da
1123 concentração usada.

1124 *9.4 Avaliação do estresse oxidativo*

1125 Os resultados do estresse oxidativo, utilizando a sonda fluorescente CellRox®
1126 são apresentados no gráfico 2. Ressaltando que esses dados são os primeiros descritos
1127 utilizando a sonda CellRox® para avaliação do estresse oxidativo para espécie bovina.



1128

1129 **Gráfico 2:** Médias e erro padrão para estresse oxidativo para os animais tratados com Vitamina C,
1130 glutaciona reduzida e associação, São Luís – 2015. Letras distintas diferem pelo teste Exato de Fisher
1131 ($P < 0,05$).

1132 Resultados divergentes quanto ao uso de antioxidantes frente ao estresse
1133 oxidativo são encontrados na literatura. Memom et al (2012), em estudo com sêmen de
1134 caprinos suplementados com vitamina C (8,5 mg/mL), constataram efeito positivo da
1135 vitamina C sobre o estresse oxidativo. Semelhante a estes últimos autores, Hong – Hu et
1136 al. (2010) também evidenciaram diminuição do estresse oxidativo para sêmen de
1137 bovinos acrescido com este antioxidante, nas concentrações de 2,5, 4,5, 6,5 e 8,5
1138 mg/mL, estes autores atribuem o efeito desse antioxidante devido a sua capacidade
1139 redutora, inibindo os danos oxidativos causado pelos ROS, tanto intra como
1140 extracelularmente. Diferindo do relatado por Asadpour et al (2011) para estudo com
1141 sêmen bovino utilizando o diluidor Tris-gema, onde esses autores não observaram
1142 diferença significativa do acréscimo da vitamina C, atuando sobre a peroxidação
1143 lipídica.

1144 Quanto a suplementação de glutaciona reduzida no diluente, Turcer et al. (2010),
1145 os quais, trabalharam com bovinos, atestaram que a glutaciona reduzida (0,5 a 2
1146 mM/mL) não preservou os espermatozoides contra o efeito do peróxido de hidrogênio

1147 para sêmen bovino, diferindo do encontrado por Perez et al. (2012) que verificaram a
1148 ação benéfica desse antioxidante sobre a lipoperoxidação em sêmen de ovinos, o mesmo
1149 encontrado por Ogata et al, 2015 em sêmen de cães.

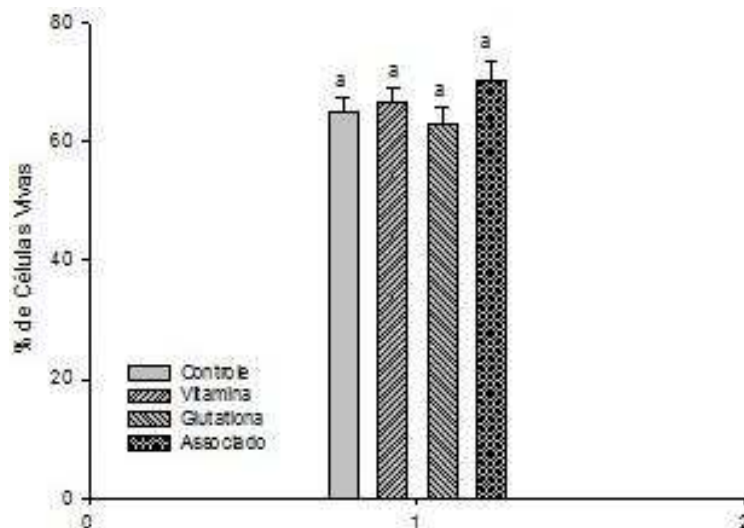
1150 Uma possível explicação para essa contradição na resposta dos antioxidantes
1151 pode ser devido os autores citados acima, terem utilizados avaliações indiretas para
1152 determinar o estresse oxidativo, como por exemplo, o ácido tiobarbitúrico (TBARS),
1153 que quantifica o produto do estresse oxidativo, enquanto que a sonda CellRox[®],
1154 avaliada experimentalmente, mensura a quantidade de ROS presentes na amostra
1155 (ALVES et al., 2015), tornando-se uma avaliação mais fidedigna para o estresse
1156 oxidativo.

1157 Quando avaliado a vitamina C e a glutathiona em associação, o grupo apresentou
1158 um maior percentual de espermatozoides com intenso estresse oxidativo ($P < 0,05$).
1159 Acreditava-se que a combinação desses antioxidantes favoreceria maior proteção aos
1160 espermatozoides, tendo um menor percentual de células espermáticas com estresse
1161 oxidativo, pois pesquisas demonstram que um único antioxidante não é capaz de
1162 preservar as características espermáticas frente as injúrias, que podem ser originadas
1163 durante a criopreservação (GADEA et al., 2004; CAMARA et al 2011).

1164 Esperava-se que a glutathiona atuasse na eliminação dos produtos do ROS,
1165 principalmente diminuindo o efeito do peróxido de hidrogênio (LENZI et al, 1994;
1166 FERREIRA e MATSUBARA, 1997; ALVAREZ e MORAES, 2006 e LUBERDA,
1167 2005), e que a vitamina C, também inibesse a peroxidação lipídica através da ação dos
1168 íons Fe^{2+} e Cu^{1+} (HALLIWELL, 1999).

1169 Contudo, a sonda CellRox detecta os radicais hidroxilas e superóxidos somente
1170 em células vivas (GRINBERG et al., 2013). Assim, para justificar esse resultado foi
1171 realizado o teste de eosina e nigrosina para determinar o número de células vivas. No
1172 entanto, estatisticamente, não houve diferença entre os grupos (gráfico 3).

1173



1174

1175 **Gráfico 3.** Médias e erro padrão para percentual de células vivas para os animais tratados com Vitamina
 1176 C, glutaciona reduzida e associação, São Luís – 2015. Letras distintas diferem pelo teste Friedman
 1177 ($P > 0,05$).

1178

1179 Entretanto, o grupo associado apresentou maior percentual de motilidade
 1180 espermática ($P < 0,05$) e, numericamente, de células vivas e integridade de membranas.
 1181 Assim, houve maior mensuração e quantificação do estresse oxidativo nesse grupo.

1182 Dessa forma, se pode afirmar que, apesar do grupo associado ter no meio
 1183 substâncias antioxidantes acrescida no diluente, a concentração utilizada de 1,25
 1184 mM/mL de cada antioxidante não foi capaz de neutralizar os ROS, levando ao maior
 1185 percentual de espermatozoides com intenso estresse oxidativo.

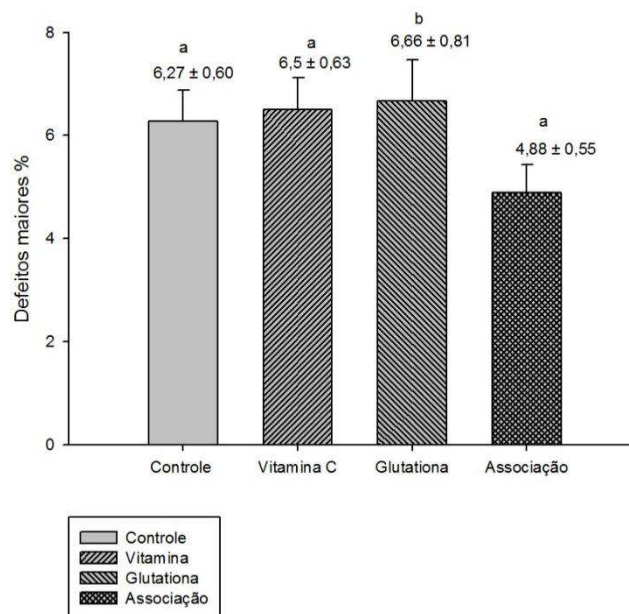
1186 Guiarreta et al. (2015), avaliando a associação da vitamina C e glutaciona
 1187 reduzida em sêmen de suínos sobre o estresse oxidativo a partir do nível de cisteína,
 1188 observaram que os resíduos de cisteína livres foram mais baixos nos tratamentos de
 1189 vitamina C e de glutaciona reduzida e associado do que no controle. Asha et al. (2003),
 1190 verificaram diminuição da lipoperoxidação induzida pelo etanol em sêmen de suínos
 1191 suplementados com selênio associado com vitamina C, levando ao aumento da ação
 1192 metabólica da glutaciona reduzida, glutaciona peroxidase e superóxidodismutase.
 1193 Respostas distintas aos valores encontrados no presente estudo, tais diferenças podem
 1194 ser explicadas pois, esses autores avaliaram o estresse oxidativo a partir de testes
 1195 indiretos.

1196 Outra hipótese é que a vitamina C, quando em associação, atuou como pró –
 1197 oxidante, uma vez que o mesmo em baixas concentrações na presença, especialmente,
 1198 de Fe^+ reage com o oxigênio favorecendo a peroxidação lipídica (DALVIT et al., 2005),

1199 o que danifica o ácido desoxirribonucleico (DNA), os lipídios e as proteínas
1200 (VALENÇA e GUERRA, 2007). Corroborando tal hipótese, Michael et al. (2007) e
1201 Monteiro et al. (2009), utilizando sêmen de cães, evidenciaram a ação pró – oxidante da
1202 vitamina C na concentração de 1,5 mM/mL e com 50 µM Bansal e Bilaspuri (2008),
1203 evidenciaram aumento na produção de malondialdeído em sêmen suplementado com
1204 vitamina C e FeSO₄, o mesmo relatado por Zanella et al (2010), os quais caracterizaram
1205 a vitamina C como pró – oxidante quando associado com a vitamina E, sendo que este
1206 antioxidante atuou na produção do radical hidroxila resultando em danos oxidativos à
1207 membrana celular.

1208 9.5 Morfologia pós – espermática

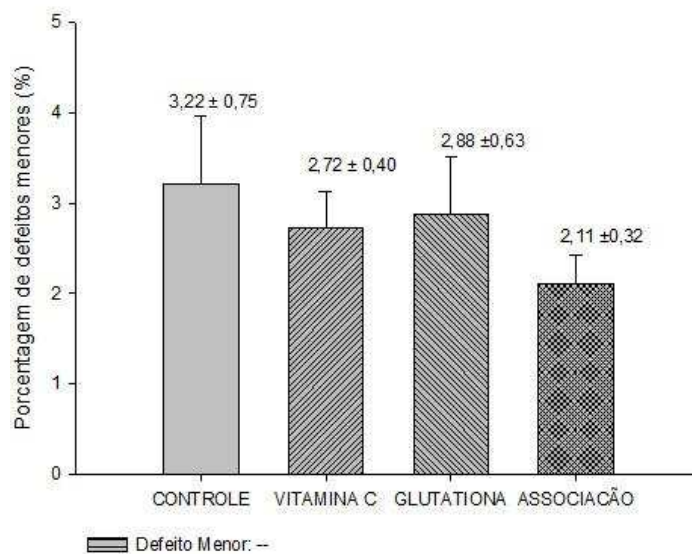
1209 O valor médio dos defeitos maiores é apresentado no gráfico 4.



1210

1211 **Gráfico 4.** Médias e erro padrão para defeitos maiores para os animais tratados com Vitamina C,
1212 glutaciona reduzida e associação, São Luís – 2015. Letras distintas diferem pelo teste Tukey (P<0,05).

1213 O valor médio dos defeitos menores é apresentado no gráfico 5.



1214

1215 **Gráfico5.** Médias e erro padrão para defeitos menores para os animais tratados com Vitamina C,
 1216 glutaciona reduzida e associação, São Luís – 2015. Não houve diferença entre as médias comparadas pelo
 1217 teste de Tukey ($P>0,05$).

1218 Após o processo de criopreservação verificou-se que o grupo associado
 1219 apresentou menor porcentagem de defeitos em relação ao grupo glutaciona reduzida
 1220 ($P<0,05$), sendo igual, estatisticamente, ao controle e vitamina C. Para os defeitos
 1221 menores não se observou diferença ($P>0,05$).

1222 Andrabi et al. (2008), em estudo com búfalos, utilizando sêmen acrescido de
 1223 vitamina C (5mM) e vitamina E (1mM) não observaram quaisquer efeitos desses
 1224 antioxidantes sobre morfologia espermática, sendo o mesmo relatado por Akhter et al.
 1225 (2011) em estudos com mesma espécie utilizando os mesmos antioxidantes. Resposta
 1226 semelhantes foram observados por Perez et al. (2012), os quais, em estudo com sêmen
 1227 de ovino não atestaram o efeito da suplementação da glutaciona sobre os defeitos
 1228 espermáticos (menores, maiores e totais), o mesmo comprovado por Turcer et al. (2010)
 1229 em estudo com sêmen ovino suplementado com glutaciona em concentrações similares
 1230 ao presente estudo.

1231 Os resultados aqui expostos e, dos autores acima, comprovam que os
 1232 antioxidantes adicionados nos diluentes não exercem influência sobre a morfologia
 1233 espermática, onde os ROS que desencadeiam a peroxidação lipídica no espermatozoide
 1234 são responsáveis por alterações metabólicas e aumento da taxa de liberação de
 1235 componentes intracelulares, a exemplo, perda acentuada da motilidade espermática
 1236 (JONES e MANN, 1977), sendo reafirmado por Castilho et al. (2009).

1237 A grande maioria das patologias espermáticas é originada durante a
1238 espermatogênese ou na criopreservação, como relatado por Watson (1995), sendo que
1239 durante este processo pode ocorrer choque osmótico e térmico desencadeando danos
1240 irreversíveis aos espermatozoides, o que afeta a estrutura celular (HAMMERSTEDT et
1241 al, 1990).

1242 Contudo, os dados de defeitos espermáticos, tanto maiores quanto menores, estão dentro
1243 da normalidade para sêmen congelado, proposto pelo CBRA (1998), independente do
1244 tratamento. Ressaltando a importância da avaliação da morfologia espermática, devido
1245 sua correlação com a fertilidade. Severo (2009) diz que é de suma importância que os
1246 espermatozoides preservem suas características físicas e morfológicas para que ocorra a
1247 fecundação.

1248 9. 6 Fecundação *in vitro*

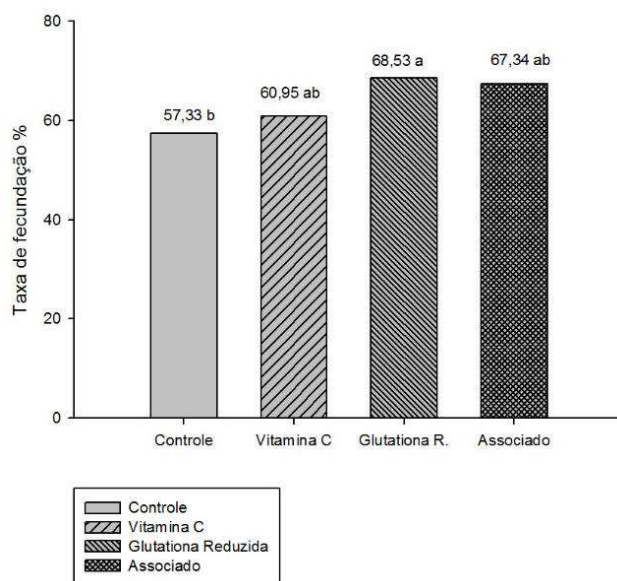
1249 318 ovários foram aspirados, obtendo 586 oócitos grau I e II que foram
1250 distribuídos de acordo com cada grupo de tratamento: grupo controle (n=150); grupo
1251 vitamina C (n= 146); grupo glutaciona (n=143) e grupo associado (n=147).

1252 Quanto à maturação oocitária, todos os oócitos (100%) ao estereomicroscópio
1253 apresentaram boa expansão das células do *cumulus oophorus* e enegrecimento destas
1254 células, apresentando ooplasma claro e com poucas granulações, validando esses
1255 oócitos para as etapas subsequentes da PIV.

1256 A motilidade espermática dos animais utilizados na PIV para o grupo controle
1257 (T1= 40%, T2 = 45% e T3 = 45%), grupo vitamina C (T1= 40%, T2= 50% e T3=45%),
1258 grupo glutaciona reduzida (T1=45%, T2=45% e T3= 50%) e grupo associado (50% para
1259 os três animais), e defeitos espermáticos totais antes da criopreservação de Touro 1:
1260 10%; Touro 2: 5%; Touro 3: 8%. Valores dentro do preconizado para espécie bovina
1261 (HERNRY e NEVES, 1998).

1262 A média do pool, de acordo com cada tratamento, das sete repetições, foi de
1263 47,85% \pm 2,67 para grupo controle; 45% \pm 0,00 para grupo vitamina C; 52,85% \pm 6,98
1264 para glutaciona reduzida e 52,85% \pm 4,87 para associado.

1265 No gráfico 6 verifica-se a taxa de fertilização, avaliado pela quantidade de
1266 blastômeros.



1267

1268 **Gráfico 6.** Taxa de fecundação in vitro, clivagem, com sêmen suplementado com Vitamina C, glutatona
 1269 reduzida e associação, avaliado pelo teste Exato de Fisher ($P<0,05$).

1270 Verificou-se que a adição da glutatona reduzida, isoladamente, no diluidor
 1271 proporcionou melhor taxa de clivagem em comparação com o grupo controle ($P<0,05$).

1272 Há poucos dados na literatura sobre o teste *in vitro* do sêmen acrescido de
 1273 antioxidantes. Borges (2008), avaliando na FIV o sêmen de bovino suplementado com
 1274 vitamina E (200 μM), não verificou diferença estatística na taxa de clivagem, apesar de
 1275 que o sêmen acrescido com este antioxidante apresentou maior índice de embriões
 1276 quando comparado ao controle. Este autor verificou que não houve diferença devido aos
 1277 defeitos espermáticos, como também ao processo de peroxidação nos espermatozoides.

1278 Dados similares no efeito da glutatona reduzida foram encontrados por Gadea
 1279 et. (2004). Estes autores verificaram que a suplementação de 1 mM e 5mM em sêmen
 1280 criopreservado de suíno favoreceu uma maior penetração nos oócitos e formação de pró
 1281 – núcleos durante a FIV. Tais eventos, segundo esses autores, podem ter sido
 1282 favorecidos pela glutatona reduzida, a qual promove proteção ao DNA,
 1283 consequentemente, levando a formação dos prós – núcleos. Entretanto, os mesmos não
 1284 conseguiram elucidar por que os espermatozoides que haviam entrado em contato
 1285 com a glutatona conseguiram penetrar com maior facilidade nos oócitos. Pois, não
 1286 houve quaisquer diferenças no acréscimo desse antioxidante sobre os outros parâmetros
 1287 avaliados, como motilidade espermática e integridade de membranas.

1288 Em estudos posteriores em sêmen bovino, Gadea et al (2007) comprovaram que
 1289 a glutatona reduzida, na concentração de 1mM e 5mM, favoreceu ao aumento no
 1290 percentual de espermatozoides viáveis, sem defeitos na cromatina e sem fragmentação

1291 de DNA, que resultou no aumento na taxa de clivagem para os espermatozoides que
1292 entraram em contato com esse antioxidante, tendo maior percentual quando acrescido de
1293 5mM de glutathione reduzida, apesar de que esse antioxidante não diferiu nos parâmetros
1294 de motilidade espermática, o mesmo comprovado por esses autores em sêmen de suíno
1295 (GADEA et al., 2004 e 2005), sendo que essa resposta, como esses mesmos autores
1296 afirmam, pode ter ocorrido devido o antioxidante ter sido adicionado após o processo de
1297 criopreservação. Assim, diminuindo o tempo de ação da glutathione. Não esquecendo,
1298 claro, da variação animal, outro fator que justifica tais afirmações.

1299 Junto a essas respostas, pode-se afirmar que os antioxidantes atuaram na
1300 preservação das células espermáticas para a característica de motilidade, quando
1301 comparado ao grupo controle, uma vez que foi observado incremento da motilidade
1302 espermática em todos os grupos tratados. Os antioxidantes podem ter atuado impedindo
1303 o processo de fosforilação no axonema, como também sobre o peróxido de hidrogênio
1304 (ANDREOTI, 2007). Assim, a motilidade espermática pode ser um fator que tenha
1305 contribuído para maior taxa de fecundação, visto que esta variável é indicadora de
1306 fertilidade (LARSON e RODRIGUEZ – MARTINEZ, 2000).

1307 Apesar de o grupo glutathione ter melhor taxa de fecundação *in vitro*, os valores
1308 para todos os grupos estão abaixo da média, que de, aproximadamente 80% de clivagem
1309 após 48 horas. O sêmen foi um dos fatores primordiais que contribuíram para tais
1310 resultados. De acordo com o teste de membranas avaliado pelas sondas fluorescentes,
1311 todos os grupos apresentaram baixo percentual de acrossoma intacto, característica
1312 indesejada para fecundação, a qual exige que os espermatozoides estejam capacitados e
1313 com integridade acrossomal, para que estes consigam atravessar as células do *cumulus*
1314 *oophorus* e a zona pelúcida (GORDON, 1994).

1315 Outro ponto foi o fator touro, pois os animais experimentados eram animais de
1316 campo que não possuíam uma genética superior e nunca haviam sido utilizados na
1317 produção *in vitro*. É de conhecimento que um dos principais fatores que interferem na
1318 PIV é a individualidade de cada reprodutor e sua resposta frente aos oócitos de cada
1319 doadora, além da sua capacidade de fecundar e produzir embriões. Watanabe et al.
1320 (1998) verificaram uma variação na taxa de clivagem, em torno de 38 a 91%, utilizando
1321 12 touros da raça Nelore.

1322 Apesar do desenvolvimento em mais de dois blastômeros, constatou-se
1323 interrupção no desenvolvimento, ocorrendo a fecundação, mas não culminando com o

1324 pleno desenvolvimento embrionário, até os estádios de mórulas e blastocistos, como
1325 observado na tabela 7.

1326

1327 **Tabela 5.** Percentual de embriões sobre o total de oócitos fecundados de acordo com cada
1328 tratamento das sete repetições da produção *in vitro*, São Luís - 2015

	Oócitos fecundado	Quantidade
Controle	86	23 (26,74%)
Vitamina C	89	17 (19,10%)
Glutaciona reduzida	98	31 (31,63%)
Associado	99	26 (26,26%)

1329 Não houve diferença estatística avaliado pelo teste Exato de Fisher ($P>0,05$).

1330 De acordo com os dados, somente o grupo glutaciona (22% em relação a
1331 quantidade de oócitos) teve melhor índice de embriões produzidos pela técnica de PIV.
1332 Camara et al. (2006) afirmaram que apenas 30 – 40% dos oócitos conseguem chegar até
1333 o estágio de blastocisto.

1334 No índice de embriões trabalhos por Gadea et al. (2007), observou-se que 1mM
1335 de glutaciona adicionada no sêmen após na descongelação já aumenta a taxa de
1336 embriões quando comparado ao controle, tendo um percentual de 29% quando utilizou
1337 1mM e 31,3 % para concentração de 5mM, em relação ao grupo controle com 22,3 %.
1338 Diversos fatores podem ter contribuído para o baixo desenvolvimento embrionário.

1339 Para a vitamina C, esse grupo apresentou menores parâmetros de motilidade
1340 espermática, integridade acrossomal resultando em menor fecundação e menor
1341 percentual de embriões. O grupo associado obteve parâmetros mais próximos do sêmen
1342 suplementado com glutaciona reduzida. No entanto, esse grupo na avaliação do estresse
1343 oxidativo, foi o que apresentou maior percentual de células com intenso estresse
1344 oxidativo. Assim, sugere-se que os defeitos da integridade da membrana plasmática e
1345 acrossomal associado com ROS, desencadeando a peroxidação lipídica, pode ter levado
1346 a um processo de fragmentação do DNA através de danos na cromatina (HUGSES et al,
1347 1996), pela ação principalmente do radical hidroxila (COMHAIRE et al., 2000). Esses
1348 espermatozoides, mesmo danificados, não perdem a capacidade de fecundar os oócitos,
1349 acarretando na ativação do genoma paterno seguido de desenvolvimento inicial,
1350 entretanto há um bloqueio nos primeiros estádios (FATEHI et al, 2006), como foi
1351 observado no presente estudo.

1352 No D7 haviam muitas células em diferentes estágios de desenvolvimento e um
1353 número bem expressivo de mórulas compactadas em relação ao número de blastócitos
1354 em todos os grupos. Para o grupo controle 82% de mórulas para 17,39% blastocisto;

1355 grupo vitamina C 82,35% e 11,76% de mórulas e blastocisto respectivamente; 64,51% e
1356 25,80% mórulas e blastocistos e no associado 84,61% e 15,38% mórulas e blastocistos,
1357 respectivamente.

1358 A peroxidação lipídica pode ter sido um fator que interferiu no desenvolvimento
1359 embrionário. Silva et al. (2007), os quais testaram, através da FIV, sêmen bovino
1360 exposto a condições de estresse oxidativo, utilizando diferentes concentração de
1361 peróxido de hidrogênio (100 e 500 mM/mL) e substâncias pró – oxidante (100 mM de
1362 ácido ascórbico e 20 mM FeSO₄), constataram que o peróxido de hidrogênio é
1363 responsável por danos as membranas plasmática do espermatozoide, e essa injúria
1364 diminui a possibilidade de desenvolvimento embrionário, onde os espermatozoides com
1365 moderado estresse oxidativo são capazes de formar embriões. Contudo, maiores
1366 quantidades de ROS vão diminuir acentuadamente a taxa de embriões, tendo bloqueio
1367 no desenvolvimento com duas células, apesar dos demais se desenvolverem
1368 normalmente. Foi observado por autores que as substâncias pró – oxidantes são mais
1369 lesivas ao espermatozoide, sendo refletido nas respostas dos embriões que param
1370 completamente seu desenvolvimento com duas células. Tais respostas obtidas por esses
1371 autores podem explicar o que ocorreu no presente estudo.

1372 A competência dos oócitos pode, também, ter influenciado a taxa da PIV, apesar
1373 do rigor na seleção destes e devido o cultivo. A qualidade do oócito é de fundamental
1374 importância, pois garante a ativação do genoma para o pleno desenvolvimento
1375 embrionário (CAMARA et al., 2008), e essa qualidade pode ser influenciada pelo
1376 estado fisiológico do animal (DODE e RODOVALHO, 2001). Em condições
1377 experimentais não houve o acompanhamento das fêmeas doadoras, pois os ovários
1378 utilizados eram de abatedouros, acarretando no desconhecimento do estado de saúde,
1379 como também no padrão hormonal dos animais experimentados. Efeitos adversos e
1380 estruturais durante o cultivo *in vitro* podem ter contribuído para o bloqueio no
1381 desenvolvimento dos embriões, tendo em vista que o cultivo dos mesmos é uma etapa
1382 determinante no desenvolvimento de embriões viáveis (BRUM et al, 2002).

1383

1384 **Conclusão**

1385 Diante dos resultados apresentados foi possível concluir que:

- 1386 • Associação de antioxidantes preserva a motilidade espermática;
- 1387 • Os antioxidantes não interferem na integridade das membranas e
- 1388 morfologia espermática;

- 1389 • A associação de antioxidante favorece maior estresse oxidativo;
1390 • Utilização de glutathione reduzida no diluidor favorece melhores respostas
1391 na fecundação *in vitro*.

1392

1393

1394 **Referências Bibliográficas**

1395

1396 ABUD, C.O.G.; ABUD, L.J.; NETO, J.C.O.; DODE, M.A.N.; J.R.B.; MARTINS,
1397 C.F. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação
1398 de sêmen bovino. **Cienc. Anim. Bras.**, v.15, p. 32-37, 2014.

1399 ACOTT, T.S.; CARR, D.W. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal
1400 fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. **Biol Reprod**, v. 30, p. 926–935,
1401 1984.

1402 ADRABI, S.M.H.; ASARI, M. S.; ULLAH, N.; AFZAL, M. Effect of non-
1403 enzymatic antioxidants in extender on post-thaw quality of buffalo (*bubalus bubalis*)
1404 bull spermatozoa. **Pakistan Vet. J.**, v. 28, p. 159-162, 2008.

1405 ADREOTI, M. Produção *in vitro* de embriões bovinos: uso da glutathione durante o
1406 processo de lavagem e capacitação espermática. **Dissertação**. Universidade Federal
1407 Rural da Amazônia. Belém, 2007.

1408 AGARWAL, A. A method of human semen centrifugation to minimize the
1409 iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **Eur Urol**, v. 28, p. 31-
1410 35, 1995.

1411 AGARWAL, A., SALEH, R. A. Role of oxidants in male infertility: rationale,
1412 significance, and treatment. **Urol. Clin. North. Am.**;29 (4):817- 27, 2002.

1413 AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female
1414 reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p.28-49, 2005.

1415 AITKEN, R.J.; HARKISS, D. e BUCKINGHAM, D.W. Analysis of lipid
1416 peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 35, p. 302–
1417 315, 1993.

1418 AITKEN, R.J.; WEST, K.; BUCKINGHAM, D. Leukocyte infiltration into the
1419 human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm
1420 function. **Journal of Andrology**, v.15, p. 343-352, 1994.

1421 AITKEN, R.J. The human spermatozoa – a cell in crisis? **Journal of Reproduction
1422 and Fertility**, v.115, p. 1-7, 1999.

1423 AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y
1424 chromosome. **Reproduction**, v.122, p.497-506, 2001.

- 1425 AITKEN, R.J.; SMITH, T.; KUCZERA, L. NAUMOUSKI, N.; CONNAUGHTON,
1426 H.; BAKER, M.A.; LUIIS, G. On methods for the detection of reactive oxygen
1427 species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to
1428 catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. **Andrology**, v.
1429 1, p. 192–205, 2013.
- 1430 AITKEN, S.; RAKHA, B.A.; ANSARI, M.S.; MURTAZA, S.; ANDRABI, H.;
1431 ULLAH, N. Storage of nili-ravi buffalo (*bubalus bubalis*) semen in skim milk
1432 extender supplemented with ascorbic acid and α -tocopherol. **Pakistan J. Zool.**, vol.
1433 43, p. 273-277, 2011.
- 1434 ALMEIDA, F.C. Estudo in vitro da fertilidade de espermatozoides criopreservados
1435 criopreservados obtidos na cauda do epididimo de touros. **Dissertação**.
1436 Universidade Acadêmica de Garunhuns da Universidade Federal de Pernambuco.
1437 2013.
- 1438 ALMQUIST, J. O.; ALLE, C.H.; BRANIAS, R.J. Effect on fertility of freezing
1439 large numbers of straws of bovine spermatozoa in a mechanical freezer. **J. Anim.**
1440 **Sci**, v. 5, p. 232 – 5, 1982.
- 1441 ALMQUIST, J.O.; WIGGINS, H.B. Survival of bull spermatozoa frozen and
1442 thawed by different methods in plastic straws. **A. I. Digest**, v.21, p 12, 1973.
- 1443 ALVAREZ, C.A.; MORAES, G.V. Efeitos da Selenometionina e vitamin C sobre o
1444 sêmen. Artigo de revisão. **Sábios: Revista Saúde e Biologia**, v.1, p. 42-51, 2006.
- 1445 ALVES, M. R. B. Tratamento da degeneração testicular em carneiros com
1446 suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade. **Dissertação**.
1447 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São
1448 Paulo, 2015.
- 1449 ALVES, M. R. B.; ARRUDA, R.P.; BATISSACO, L.; RODRIGUEZ- FLOREZ,
1450 S.A.; LANÇONI, R.; OLIVEIRA, B.M.M, RAVAGNANI, G.M.; ALMEIDA, T.G.;
1451 VELLONE, V.S.; CELEGHINI, E.C.C. An Efficient Technique to Detect Sperm
1452 Reactive Oxygen Species: The CellRox Deep Red® Fluorescent Probe. **Biochem**
1453 **Physiol**, v. 4, 2015.
- 1454 AMARAL, A.; LOURENÇO, B.; MARQUES, M.; RAMALHO - SANTOS, J.
1455 Mitochondria functionality and sperm quality. **Society for Reproduction and**
1456 **Fertility**, p. 1470–1626, 2013.
- 1457 AMARAL, A.; RAMALHO-SANTOS, J.; JOHN, J.C. The expression
1458 of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of
1459 mitochondrial DNA content in mature human sperm. **Human Reproduction**, v. 22,
1460 p.1585–1596, 2007.
- 1461 AMMAN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of
1462 cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**,
1463 v. 7, n 3, p. 145- 173, 1987.
- 1464 AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **J Androl**, v.25,
1465 p.317-325, 2004.

- 1466 ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFITERI, A.A.
 1467 Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e
 1468 principais mecanismos antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.34, n.2, p.79-85,
 1469 2010.
- 1470 ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.;
 1471 MARTINS, S.M.M.K.; RAFHAEL, C.F.; MORETI, A.S. Fluorescent stain method
 1472 for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of
 1473 plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reprod Dom Anim**, v. 42, p.
 1474 190–194, 2007.
- 1475 ANDERSON, M. J; DIXSON, A.F. Sperm competition – motility and the midpiece
 1476 in primates. **Nature**, p. 416 – 496, 2002.
- 1477 ANSARI, M.; RAKBHA, B.A.; ANDRABI, S.M.H.; OLLHAN, N.; IQBAL, R.;
 1478 HOLT, W.; AKTHER, S. Glutathione-supplemented tris-citric acid extender
 1479 improves the post-thaw quality and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull
 1480 spermatozoa. **Reproductive Biology**, p. 271-276, 2012.
- 1481 ANTON, M.; GANDEMER, G. Composition, solubility and emulsifying properties
 1482 of granules and plasma of egg yolk. **J Food Sci**, v.62, p.484-487, 1997.
- 1483 ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o
 1484 espermatozóide equino pelo uso demicroscopia de epifluorescência, citometria de
 1485 fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).
 1486 2000. 121f. **Tese (Livre Docência)** - Faculdade de Medicina Veterinária e
 1487 Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- 1488 ARRUDA, R.P; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; GARCIA, A.R.;
 1489 NASCIMENTO, J.; RAPHAEL C.F.; SOUZA, L.W.O. Importância da qualidade do
 1490 sêmen em programas de IATF e TETF. In: **Simpósio Internacional de**
 1491 **Reprodução Animal Aplicada**, v.1, p. 166-179, 2004.
- 1492 ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.;
 1493 NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do
 1494 potencial de fertilidade do sêmen equino. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p.8-16,
 1495 2007.
- 1496 ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; GARCIA, A.R.; SANTOS, G.C.; LEITE,
 1497 T.G.; OLIVEIRA, L.Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M.P. Morfologia
 1498 espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Rev. Bras. Reprod.**
 1499 **Anim.**, v.39, p.47-60, 2015.
- 1500 ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.;
 1501 HELLSTROM, W.J.; SIKKA, S.C. Characterization of reactive oxygen species
 1502 induced effects on human spermatozoa, and energy metabolism. **Free Radic Biol**
 1503 **Med**, v.26, p. 869-880, 1999.
- 1504 ASADPOUR, R.; JAFARI, R.; NASSARABADI, H.T. Effect of various levels of
 1505 catalase antioxidant in semen extenders on lipid peroxidation and semen quality
 1506 after the freeze-thawing bull sêmen. **Veterinary Research Forum**, v. 4, p. 218-221,
 1507 2011.

- 1508 ASADPOUR, R. JAFARI, R.; TAYEFI-NASRABADI, H. The effect of antioxidant
1509 supplementation in semen extenders on semen quality and lipid peroxidation of
1510 chilled bull spermatozoa. **Iranian Journal of Veterinary Research**, vol. 13, 2012.
- 1511 ASSUMPÇÃO, T.I.; SOUZA, M.A.; ALBERTON, C.; PALLAORO, R.;
1512 KITAGAWA, C.; SILVA, N.A.M. Características reprodutivas de machos bovinos
1513 da raça Nelore da fase pré-púbere à maturidade sexual. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 20, p.
1514 148-154, 2013
- 1515 ASHA, G.; SIVARAM, M.V.; SURESH, M. I. Combined effect of ascorbic acid
1516 and selenium supplementation on alcohol-induced oxidative stress in guinea pigs.
1517 **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 134, p. 397–401, 2003.
- 1518 AURICH, J.E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of
1519 antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen.
1520 **Theriogenology**, v. 48, p. 185-192, 1997.
- 1521 AZIS, N.; SALEH, R.; SHARMAN, R.K.; JONES, I.L.; ESFANDIARI, N.;
1522 THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. Novel association between sperm reactive oxygen
1523 species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index.
1524 **Fertility and Sterility**, v.2, p. 12-17, 2004.
- 1525 BANSAL, A.K; BILASPURI, G.S. Effect of ferrous sulphate and ascorbic acid on
1526 motility, viability and lipid peroxidation of crossbred cattle bull spermatozoa. **The**
1527 **Animal Consortium**, v 2:1, p. 100–104, 2008.
- 1528 BARTH, A. D; OKO, R.J. Normal bovine spermatogenesis and sperm maturation.
1529 *In* Abnormal morphology of bovine spermatozoa. 1 edição, Cap 3, pag. 21 a 49,
1530 1989.
- 1531 BARBIOR, B.M. Superoxidase: a two – edged sword. **Brazilian Journal of**
1532 **Medical and Biological Research**, v. 30, p.141-155, 1997.
- 1533 BARREIROS, A.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de
1534 espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- 1535 BARKER, M.A.; AITKEN, R.J. The importance of redox regulated pathways in
1536 sperm cell biology, **Molecular and Celular Endocrinology**, v.216, p. 47-54,
1537 2004.
- 1538 BAUMBER J, BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL,
1539 M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability,
1540 acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid
1541 peroxidation. **J Androl**, v.21, p.895-902, 2000.
- 1542 BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B. A. Reactive oxygen species
1543 promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa.
1544 **Theriogenology**, v.60, n.7, p.1239-1247, 2003.
- 1545 BECONI, M.T., FRANCA, C.R., MORA, N.G. AND AFFRANCHINO, M.A.
1546 Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation.
1547 **Theriogenology**, v.40, p. 841-851, 1993.

- 1548 BEORLEGUI, N.; CETICA, P.; TRINCHERO, G.; CÓRDOBA, M.; BECONI, M.
1549 Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine
1550 sperm. **Andrologia**, v.29, p.37-42, 1997.
- 1551 BERNARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH
1552 Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiol Ver**, v. 87, p. 245–313, 2007.
- 1553 BERTHO, A.L. Citometria de fluxo: **Apostila da Fiocruz, LIP- JOCC- NCmF**,
1554 2001.
- 1555 BERTOZZO, B.R; ZÚCCARI, C.E.S.N. Efeito da adição de colesterol ao meio de
1556 incubação do sêmen bovino congelado sobre a integridade das membranas
1557 plasmática e acrossomal. X Encontro Iniciação Científica UFMS, 2009.
- 1558 BILODEAU, J. F.; CHATEERJEE, S.; SIRRARD, M. Levels of antioxidant
1559 defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and
1560 thawing. **Mol. Reprod. Dev. Nova York**. v. 55, p. 282-288, 2000.
- 1561 BILODEAU, J.F., BLANCHETTE, S., CORMIER, N., SIRAD, M.A. Reactive
1562 oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender:
1563 protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase.
1564 **Theriogenology**. 57: 1105-1122, 2002.
- 1565 BORGES, J. C. Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a
1566 criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares,
1567 inseminação artificial e fecundação *in vitro*. **Tese de Doutorado**. Faculdade de
1568 Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, 2008.
- 1569 BORGES, J. C. Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na
1570 criopreservação do sêmen bovino. **Tese de Mestrado**. Universidade Federal de
1571 Viçosa, Minas Gerais, 2003.
- 1572 BOVERIS, A.; CHANCHE, B. The Mitochondrial Generation of Hydrogen
1573 Peroxide. **Biochem. J.**, v.134, p.707-716, 1973.
- 1574 BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPING, J.J. Interactions between Somatic
1575 cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v.
1576 43, p. 543-547, 1990.
- 1577 BUETTNER, G.R.; JURKIEWICZ, B.A. The ascorbate free radical as a marker of
1578 oxidative stress: An EPR study. **Radic Biol Med**, v. 14, p. 49-55, 1993.
1579
- 1580 BUERTER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid
1581 peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Arch Biochem Biophys**, v. 300, p.
1582 535-43, 1995.
- 1583 BUSTAMANTE – FILHO, I. C. Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen
1584 equino. **Tese de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande de Sul, Porto
1585 Alegre, 2006.
- 1586 BRANDÃO, A.C, ARRUDA, R.P., MADUREIRA, E.H., PANATTONI, J.F.,
1587 MARTINS, ASSUMPÇÃO, M.E., J.A. Influência do glicerol e etilenoglicol e da

- 1588 criopreservação sobre o complexo DNA-Proteína de espermatozóides em garanhões.
1589 **Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo**, v. 43, suplemento, p. 68-73, 2006.
- 1590 BREITBART, H. Signaling pathways in sperm capacitation and acrossomal
1591 reaction. **Cell. Mol. Biol.**, v. 49, p. 321-327, 2003.
- 1592 BROUWERS, J.F.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of
1593 lipidperoxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radic Biol Med**, v. 35,
1594 p.1382–1391, 2003.
- 1595 BRUUM, D.S.; LEIVAS, F.G.; BERNARDI, M.L.; RAUBER, L.P.; MEZZALIRA,
1596 A.; BRASS, K.A.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Cultivo individual de
1597 blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. **Braz. J. vet.**, v. 39, n. 2, p. 87-92, 2002.
- 1598 CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal- Manual de Andrologia, 1998.
- 1599 CAMARGO, L.S.A.; VIANNA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE
1600 FILHO, V.R. Factors influencing in vitro embryo production. **Anim. Reprod.**, v.3,
1601 p.19-28, 2006.
- 1602 CASEY, P.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.;
1603 DROBINS, E.; Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates
1604 between living and dead sperm. **J Androl**, v. 14, p. 289–297, 1993.
- 1605 CASTRO, S. R. S. Uso de antioxidantes para elevação da qualidade do sêmen
1606 criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*). **Tese de Mestrado**. Universidade de
1607 Federal do Pará. 2010.
- 1608 CASTILHO, E.F.; GUIMARAES, J.D.; MARTINS, L.F.; PINHO, R.O.;
1609 GUIMARAES, S.E.I.; ESPESCHIT, C.J.B. Uso de própolis e ácido ascórbico na
1610 criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.2335-
1611 2345, 2009.
- 1612 CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovinos sobre as
1613 membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos
1614 espermatozóides utilizando sondas fluorescentes. São Paulo, 2005.186 p.
1615 **Dissertação** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Departamento de Reprodução
1616 Animal. Universidade Federal de São Paulo. 2005.
- 1617 CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. DE; ANDRADE, A. F. C. DE;
1618 NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm
1619 simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial
1620 membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479–488, 2007.
- 1621 CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ALBUQUERQUE, R.; SILVA, F.H.A.;
1622 FARIA, D.E.; ANDRADE A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL C. F. Utilization
1623 of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasmatic,
1624 acrosomal, and mitochondrial membranes of rooster spermatozoa. **Brazilian
1625 Journal of Poultry Science**, v. 9, p. 143-149, 2007b
- 1626 CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.;
1627 ARRUDA, R.P. Simultaneous assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial

- 1628 membranes of ram sperm by fluorescent probes. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.62,
1629 p.536-543, 2010.
- 1630 COMHAIRE, F. H.; CHRISTOPHE, A. B.; ZALATA, A. A.; DHOOGHE, W. S.;
1631 MAHMOUD, A. M.; DEPUYDT, C. E. The effects of combined conventional
1632 treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile
1633 men. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 63 p. 159–165,
1634 (2000).
- 1635 CHRISTOVA, Y.; JAMES, P.S.; JONES, R. Lipid diffusion in sperm plasma
1636 membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. **Mol Reprod**
1637 **Dev**, v.68, p.365-372, 2004.
- 1638 CHATTERJEE, S.; DE LAMIRANDE, E.; GRAGNON, C. Criopreservation alters
1639 membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione.
1640 **Mol Reprod Dev**, v.60, p.498-506, 2001.
- 1641 CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**,
1642 v. 59, p. 7–11, 1998.
- 1643 DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using
1644 acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v.
1645 48, p. 831- 41, 1997.
- 1646 DALVIT, G.; LLANES, S.P.; DESCALZO, A.; INSANI, M.; BECONI, M.;
1647 CETICA, P. Effect of Alpha-Tocopherol and Ascorbic Acid on Bovine Oocyte in
1648 Vitro Maturation. **Reprod Dom Anim**, v. 40, p. 93–97, 2005.
- 1649 DASS, N.J.H.G. Laboratory assessment of semen characteristics, **Animal**
1650 **Reproduction Science**, v. 28, p. 87- 94, 1992.
- 1651 DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de
1652 compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- 1653 DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of in vitro maturation
1654 media: a review. **Reprod. Domest. Anim.**, v.45, p.476-482, 2010.
- 1655 DENEKE, S. M.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **Am J**
1656 **Physiol**, v. 257, p. 163-73, 1989.
- 1657 De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C.
1658 Reactive Oxygen species and sperm physiology. **Rev Reprod**, v.2, p.48-54, 1997.
- 1659 De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and
1660 capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radic Biol Med**, v.14, p.255-
1661 265, 1993.
- 1662 De MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; BALDASSARE, H. Effect of
1663 cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte
1664 maturede in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, v.42, p.432-436, 1995.
- 1665 De MATOS, D.G.; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S.R.; THOPSOM, J.G.
1666 Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine

- 1667 oocytes on embryo development and intracellular peroxide content.
1668 **Theriogenology**, v.57, p.1443-1451, 2002.
- 1669 De MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione
1670 (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-
1671 mercaptoethanol, cysteine and cystine. **Theriogenology**, v.53, p.761-771, 2000.
- 1672 DIAS, J.C.; EMERICK, L.L.; ANDRADE, V.J.; MARTINS, J.A.M.; VALE
1673 FILHO, V.C. Concentrações séricas de testosterona em touros jovens Guzerá e suas
1674 associações com características reprodutivas. **Archives of Veterinary Science**,
1675 v.19, p.24-31, 2014.
- 1676 DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, V. G.; ALVES, R. G. A. Number
1677 and morphology of oocytes obtained from ovaries of zebu cows according to 35
1678 follicle size, physiological status and season. **Archivos de Zootecnia**, v.50, p. 415-
1679 418, 2001.
- 1680 DRODE, W. Free radicals in the physiological control of cell function.
1681 **Physiological Reviews Published**, vol. 82, p. 47-95, 2001.
- 1682 EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. *In*: Knobil and Neill's physiology
1683 of reproduction, Cap 2, p. 29 – 77, 1994.
- 1684 ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human
1685 spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v.31,
1686 p.17-22, 1999.
- 1687 FAHY, G. M. Analysis of “solution effects” injury. Equations for calculating phase
1688 diagram information of the ternary system NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-
1689 glycerol-water. **Biophys J.**, v.32, p.837-850, 1980.
- 1690 FARLIN, M.E; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of
1691 *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa.
1692 **Mol Reprod Dev**, v.32, p.23-27, 1992.
- 1693 FATEHI, A.N.; BEVERS, M.M.; SHOEVEERS,E.; ROELEN, B.A.J.;
1694 COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. DNA damage in bovine sperm does not
1695 block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the
1696 first cleavages. **Journal Andrology**, v. 27, p. 176 – 188, 2006.
- 1697 FEUGANG, J. M.; R. DE ROOVER A. M.; LÉONARD, S.; DESSY, F.;
1698 DONNAY, I. Addition of beta- mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst
1699 stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis
1700 and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology** 61: 71-90, 2004.
- 1701 FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças
1702 relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med**, v. 43(1), p. 61-
1703 8, 1997.
- 1704 FILAPPIL, A. PRESTESL, D.; ROCHA, R.; SCHOSLLER, D.R.; BORDANLL,
1705 C.; BRAGANÇA, J.F.; CECIM, M. Qualidade seminal e histomorfometria dos
1706 órgãos reprodutivos de ovinos tratados com fluoreto de sódio. **Ciência Rural**, v.38,
1707 2008.

- 1708 FISHER, H.M.; AITKEN, R.J. Comparative analysis of the ability of precursor
1709 germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites.
1710 **Journal of Experimental Zoology**, v. 277, p. 390-400, 1997.
- 1711 FLESCH, F.M; GADELLA, B.M. Dynamic of the mammalian sperm membrane in
1712 the processo f fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p 197-235,
1713 2000.
- 1714 FRAGA, C.G.; MOTCHNICK, P.A.; HELBOCK, H.J; JABOB, R.A; AMES, B.N.
1715 Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm.
1716 **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.88, p. 110003 – 110006, 1991.
- 1717 GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A.; COY, P.; MATÁS, C.; ROMAR, R.;
1718 RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation.
1719 Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders.
1720 **Theriogenology**, v.62, p.690-701, 2004.
- 1721 GADEA, J. GUMBAO, D.; MATÁS, ROMAR, R. Supplementation of the thawing
1722 media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability
1723 of boar spermatozoa after cryopreservation. **Journal of Andrology**, vol. 26, 2005.
- 1724 GADEA, J.; GUMBAO, D.; CANOVAS, S.; GARCÍA – VAZQUEZ, F.A.;
1725 GRULLÓN, L.A.; GARDÚN, J.C. Supplementation of the dilution medium after
1726 thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertility ability
1727 of frozen – thawed bull spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.31, p.
1728 40-49, 2007.
- 1729 GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes
1730 resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochimica et**
1731 **Biophysica Acta**, v.1271, p.321-326, 1995.
- 1732 GALLEGO, M. A. Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia
1733 e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozoides bovinos
1734 sexados por citometria de fluxo. 110 f. **Dissertação** (Mestrado em Reprodução
1735 Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São
1736 Paulo, São Paulo, 2010.
- 1737 GARNER, D.L.; PINKEL, D. P.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of
1738 spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis.
1739 **Biol Reprod**, v. 34, p. 127– 138, 1986.
- 1740 GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A. Viability assessment of mamalian sperm using
1741 SYBR-14 and Propidium iodide. **Biol Reprod**, v.53, p.276-284, 1995.
- 1742 GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.;
1743 MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and
1744 viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 57, p. 1401–1406,
1745 1997.
- 1746 GAVELLA, M.; LIPOVAC, V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase)
1747 activity and isoenzyme pattern of sperm in infertile men. **Arch. Androl**, v.28, p.35-
1748 41, 1992.

- 1749 GILLIAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of
1750 sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445-457,
1751 2005.
- 1752 GOMEZ, E.; BUCKINGHAM, D. W.; BRINDLE, J.; LANZAFAME, F.; IRVINE,
1753 D.S.; AITKEN, J. Development of an image analysis system to monitor the
1754 retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with
1755 biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function.
1756 **Journal of Andrology**, v.17, p. 276-287, 1996.
- 1757 GONÇALVES, A. A.; CASTRO, S.R. S.; GARCIA, A. R.; SANTOS, A. X.;
1758 SILVA. G.R; BARROS, D.V. efeito de substâncias antioxidantes no sêmen
1759 criopreservado de búfalos (*bubalus bubalis*). XXV Reunião Anual da Sociedade
1760 Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), p. 451, 2011.
- 1761 GONZALEZ, R.A.F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de
1762 congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de
1763 membrana do espermatozóide e a integridade de membrana do espermatozóide
1764 bovino. 2004. 92f. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e
1765 Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- 1766 GORDON I. Oocyte recovery and maturation. **CAB International**, p.30-65,1994.
- 1767 GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G.Z.; Maturação de oócitos bovinos e influência na
1768 aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev Bras Reprod**
1769 **Anim**, v.33, p.82-94, 2009.
- 1770 GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de antioxidantes e
1771 antioxidantes na andrologia. **Rev. Reprod. Anim.** V.28, p. 187- 195, 2004.
- 1772 GUERIN P.E.L.; MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and
1773 protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its
1774 surroundings. **Hum. Reprod.**, v.7, p.175-189, 2001.
- 1775 GUIARETTA, E.; ESTRADA, E.; BUCCI, D.; SPINACI, M.; RODRIGUEZ, GIL,
1776 J.; YESTE, M. Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary
1777 beneficial effects on boar sperm cryotolerance. **Theriogenology**, v.83, p. 399-407,
1778 2015.
- 1779 GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell
1780 viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry.
1781 **Biol Reprod**, v. 43, p.55–64, 1990.
- 1782 GRINBERG, Y. Y.; VAN DRONGELEN, W.; KRAIG, R. P. Insulin-like growth
1783 factor-1 lowers spreading depression susceptibility and reduces oxidative stress.
1784 **Journal of Neurochemistry**, v. 122, p. 221–9, 2012.
- 1785 GRINBERG, Y. Y.; DIBBERN, M. E.; LEVASSEUR, V. A.; KRAIG, R. P.
1786 Insulin-like growth factor-1 abrogates microglial oxidative stress and TNF- α
1787 responses to spreading depression. **Journal of Neurochemistry**, v. 126, p. 662–72,
1788 2013.
- 1789 HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J.M.C. Radicals in Biology and Medicine,
1790 acesso online, p. 1998, 1991.

- 1791 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants,
1792 and human disease: where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, p. 598-620,
1793 1992.
- 1794 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine,
1795 3rd edn. Oxford: Clarendon Press, 1999.
- 1796 HALLIWELL, B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in
1797 nutritional studies? How far have we come? **Am J Clin Nutr**, v. 72(5), p.1082-7,
1798 2000.
- 1799 HALLIWELL, B.; CLEMENT, M.V.; LONG, L.H. Hydrogen peroxide in the
1800 human body. **Febs lett**, v 486, p. 10 –13, 2000.
- 1801 HAMMERSTEDT, R.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of
1802 mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, n.1,
1803 p.73-88, 1990.
- 1804 HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess
1805 membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and
1806 Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.
- 1807 HENSLEY, K.; ROBINSON, K. A.; GABBITA, S. P.; SALSAMAN, S.; FLOYD, R.
1808 A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Radic. Biol. Med.**, v.15,
1809 p. 1456–1462, 2000.
- 1810 HENRY, M.; NEVES, J.P. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen
1811 animal. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
- 1812 HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species
1813 and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000.
- 1814 HOUNG- HU, J.; TIAN, W.Q.; ZHAO, X.L.; ZAN, L.S.; WANG, G.H.; LI, Q.N.;
1815 XI,P.P. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine
1816 semen quality. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p.71-77, 2010.
- 1817 HUGHES, C.M.; LEWIS, S.E.M.; MCKELVEY-MARTIN, V.J.; THOMPSON, W.
1818 A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from
1819 fertile and infertile men, using a modified comet assay. **Molecular Human
1820 Reproduction**, v.2, p. 613-619, 1996.
- 1821 HUNTER, A.G.; NORNES, H.O. Characterization and isolation of a spermcoating
1822 antigen from rabbit seminal plasma with capacity to block fertilization. **J Reprod
1823 Fertil**, v. 20, p.419–427, 1969.
- 1824 ICKOWICZ, D.; BREITBART, F.H. Mechanism of sperm capacitation and the
1825 acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian Journal of Andrology**, v.14, 816–
1826 821, 2012.
- 1827 IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.P. Evaluation of the Hamilton-Thorn
1828 computer-based automated system for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55,
1829 p.733-749, 2001.

- 1830 IWASAKI, A.; GOGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa
1831 of infertile patients. **Fertil. Steril**, v. 52(2), p.409-16, 1992.
- 1832 JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic
1833 indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology**
1834 **& Medicine**, v. 9, n. 6, p. 515–540, 1990.
- 1835 JANUSKAUSKAS A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and
1836 relation semen characteristics to bulls fertility. **Vet Zootech**, v.39, p.1-8, 2002.
- 1837 JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS**
1838 **Veterinaria**, v.10, p.156-165, 1994.
- 1839 JEDRZEJOWSKA, R. W., WOLSKI, J. K., HILCZER, J. S. The role of oxidative
1840 stress and antioxidants in male fertility. **Central European Journal of Urology**, p.
1841 60-67, 2012.
- 1842 JIALAL, I.; GRUNDY, S.D. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation.
1843 **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.669, p.239-248, 1992.
- 1844 JONES, R.T; MARTIN, I.C.A. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5° C
1845 on the ultrastructure of ram spermatozoa. **J. Reprod. Fert**, v. 35, p. 311 – 320,
1846 1973.
- 1847 JONES, R.; MANN, T. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards
1848 spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.50, p.255-260, 1977.
- 1849 KAMP, G.; BUSSELMANN, G.; JONES,N. WESNER, B.; LAUTERWEIN, J.
1850 Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa, **Reproduction**, v.126,
1851 p. 517–525, 2003.
- 1852 KOMAMISRUD, E.; GRAFFER,T.; STEINER,T. Comparison of two processing
1853 systems for Bull semen with regard to post thaw motility and nonreturn rates.
1854 **Theriogenology**, v.45, n.8, p.1515-1521, 1996.
- 1855 KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; PLESSES, S.S. Free radicals:
1856 Their beneficial and detrimental effects on sperm functions. **Indian Journal of**
1857 **Experimental Biology**, v.48, p.425-435, 2010.
- 1858 KÜHN, H.; BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the
1859 interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free Radical Biology &**
1860 **Medicine**, v. 33, n. 2, p. 154- 172, 2002.
- 1861 KUMAR, P.; KUMAR, D.; SIKKA, P.; SINGH, P. Sericin supplementation
1862 improves semen freezability ofbuffalo bulls by minimizing oxidative stress
1863 duringcryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 152, p.26–31, 2015.
- 1864 KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **J Anim Sci**, v.82,
1865 p.45-51, 2004.
- 1866 LANDA, C.A; ALMQUIST, J.O. Effect of freezing large number of straws of
1867 bovine spermatozoa in an automatic freezer on post – thaw motility and acrossomal
1868 retention. **J. Anim. Scie**, v. 49, p. 1190-4, 1979.

- 1869 LARSSON, B; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization
1870 tests to predict semen fertility? **Anim Reprod Sci**, v.60-61, p.327-336, 2000.
- 1871 LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; TERMINALI, O.;
1872 PASSI, S.; DONDERO, F. Gluthatione treatment of dyspermia: effect on the
1873 lipoperoxidation process. **Human Reprod.**, v. 9, p. 2044-50, 1994.
- 1874 LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm
1875 plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm
1876 function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, n.3, p
1877 246 – 256, 1996.
- 1878 LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R; ZÚCCARI, C. E. S. N.;
1879 COSTA E SILVA, E. V. Criopreservação do Sêmen Bovino. UNOPAR. **Cient**
1880 **Ciênc Biol Saúde**, v. 13, p.279-86, 2011.
- 1881 LIFETECNOLOGIES COMMUNICATION. **Manual da sonda Cellrox®**, acesso
1882 em agosto de 2015, <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>.
- 1883 LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em
1884 amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 37, 2001.
- 1885 LIVINGSTON, T.; RICH, K.; MACKENZIE, S.; GODKIN, J.D. Glutathione
1886 content and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes. **Anim**
1887 **Reprod Sci**, v. 116, p.265-273, 2009.
- 1888 LOVELOCK, J. E.; BICHOP, M. W. Prevention of freezing damage to living cells
1889 by dimethyl sulphoxide. **Nature**, v. 183, p. 1394-5, 1959.
- 1890 LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reprod. Biol.**, v. 5,
1891 n. 1, p. 5 – 17, 2005.
- 1892 LUZ, H. K. M, WANDERLEY, L. S, FAUSTINO, L. R, SILVA, C. M. G.,
1893 FIGUEIREDO, J. R., RODRIGUES, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na
1894 criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**,
1895 v.39, p. 956, 2011.
- 1896 MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermiática em
1897 mamíferos: uma revisão. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.33, p.183-193, 2009.
- 1898 MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipids binding
1899 proteins. **J. Reprod. Immuno.**, v.53, p.109-119, 2002.
- 1900 MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and
1901 antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical**
1902 **Biochemistry**, v. 21, p. 80-89, 2006.
- 1903 MARTIN- du PAN, R.C; CAMAPANNA, A. Physiopathology of spermatogenic
1904 arrest. **Fertil. Steril**, v. 60, p 937 – 946, 1993.
- 1905 MARTINS, L.F.; PARAIZO, A.M.; OLIVEIRA, R.R.; CASTILHO, E.F.;
1906 GUIMARAES. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e
1907 tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. **R. Bras.**
1908 **Zootec.**, v.40, p.1519-1525, 2011.

- 1909 MARQUES, A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GOBESSO, A. A. O.;
 1910 NEVES NETO, J. R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine
 1911 cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v.58, p.257-
 1912 260, 2002.
- 1913 MARKLUND, S. L.; WESTMAN, N. G.; LUNDGREN, E.; ROOS, G. Copper- and
 1914 zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase,
 1915 catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and
 1916 normal human tissues. **Cancer Res**, v. 42, p. 1955-1961, 1982.
- 1917 MAZUR, P.; LEIBO, S.P; CHU, E.H. A two-factor hypothesis of freezing injury.
 1918 Evidence from chinese hamster tissue-culture cells. **Exp Cell Res**, v. 71, p.345-55,
 1919 1972.
- 1920 MAZUR , P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. J.**
 1921 **Physiol.**, v. 247, p. 125-142, 1984.
- 1922 MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.O.; RODRIGUES, J.L.
 1923 Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, v.
 1924 57,p. 327 – 344, 2002.
- 1925 MEHLHOM, R.J., SUMIDA, S.; PICKED, L. Tocopheroxyl radical persistence and
 1926 tocoferol consumption in liposomes and vitamin E – enriched rat liver mitochondria.
 1927 **Jornal of Biological Chemistery**, v. 264, p. 13448-133452, 1989.
- 1928 MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**,
 1929 v. 52, p. 711-760, 1983.
- 1930 MELAMED, M.R.; MULLANEY, P.F.; MENDELSON, M.L. Flow cytometry and
 1931 sorting. **John Wilwy & sons**, 1979.
- 1932 MEMOM, A.A.; WAHIDA, H.; ROSNINA, Y.; GOH, Y.M.; EBRAHIM, M.;
 1933 NADIA, F.M. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress
 1934 parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender.
 1935 **Animal Reproduction Science**, v. 136, p. 55– 60, 2012.
- 1936 MERTON, J. S.; KNIJN, H. M.; FLAPPER, H.; DOTINGA, F.; ROELEN, B. A. J.;
 1937 VOS, P. L. A. M.; MULLAART, E. Cysteamine supplementation during in vitro
 1938 maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic
 1939 development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf
 1940 characteristics. **Theriogenology**, v. 71, p.1–7, 2013.
- 1941 MESSIAS, C. Algumas características do sêmen do cão após diluição e
 1942 resfriamento. **Tese de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná. 61p. 2000.
- 1943 MICHAEL, A.J; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA,
 1944 D.; SARATSI, P.; BOSCO, C. Effect of antioxidant supplementation on semen
 1945 quality and reactive oxygen species of frozen–thawed canine spermatozoa.
 1946 **Theriogenology**, v.68, p. 204–12, 2007.
- 1947 MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA,
 1948 D.; SARATSI, P.; BOSCO, C. Quality and reactive oxygen species of extended
 1949 canine sêmen after vitamin C supplementation. **Theriogenology**, v. 70, p. 827–835,
 1950 2008.

- 1951 MILLER, D.; OSTERMEIER, G.C.; KRAWETZ, S.A. The controversy, potential
1952 and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med*, v.11, p.156-163, 2005.
- 1953 MONTEIRO, J.C.; GONÇALVES, J.S.A.; RODRIGUEZ, J.A.; LUCIO, C.F.;
1954 SILVA, L.C.G.; ASSUMPÇÃO, M.E.D.A.; VANNUCCHI, C.I. Influence of
1955 Ascorbic Acid and Glutathione Antioxidants on Frozen-Thawed Canine Semen,
1956 **Reprod Dom Anim**, v. 44, p. 359–362, 2009.
- 1957 MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis
1958 of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, pag. 403 –
1959 439, 1997.
- 1960 MOREIRA, D.S.; LINS, V.G. Técnicas de microscopia para quantificação e
1961 identificação de microrganismo. **Saúde e Ambiente**, v.5, p.01-11, 2010.
- 1962 MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. *et al.* Low density lipoproteins
1963 extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-
1964 thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.
- 1965 NAYANATARA, A.K.; VINODINI, N.A.; AHMED, B.; RAMASWAMY, C.R,
1966 SHABARIANTH, R. B. Role of ascorbic acid in monosodium glutamate mediated
1967 effect on testicular weight, sperm morphology and sperm count, in rat testis.
1968 **Journal of Chinese Clinical Medicine**, v.3, p. 1-5, 2008.
- 1969 NICH, M. Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos
1970 lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na Região de
1971 Dourado. **Tese de Mestrado**. Universidade de São Paulo, 2003.
- 1972 NOLAN, J.P.; HAMMERSTEDT, R. Regulation of membrane stability and the
1973 acrosomereaction in mammalian sperm. **The Journal of the Federation of**
1974 **American Societies Experimental Biology**, v 11, n. 8 p. 670-682, 1997.
- 1975 NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the
1976 mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n.11,
1977 p.1287-1312, 2001.
- 1978 OEDA, T., HENKEL, R., OHMORI, H.; CHILL, W. B. Scavenging effect of N-
1979 acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible
1980 therapeutic modality for male factor infertility? **Andrologia**, v.29, p. 125–131, 1997
- 1981 OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reative oxygen
1982 species. **Human Reproduction**, v.5, n.5, p.399-420, 1999.
- 1983 O' FLAHERTY, C.M.; BEORLEGUI, N.B.; BECONI, M.T. Reactive oxygen
1984 species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction.
1985 **Theriogenology**, v.52, p. 289-301, 1999.
- 1986 O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M.T. Participation of superoxide
1987 anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **Int J Androl**, v.26, p.109-
1988 114, 2003.
- 1989 OGATA, K. SASAKI, A.; KATO, Y.; TAKEDA, A.; WAKABAYASHI, M.;
1990 SARENTONGLAGA, B.; YAMAGUCHI, M.; HARA,.; FUKUMORI, R.; NAGAO,
1991 Y. Glutathione supplementation to semen extender improves the quality of frozen-

- 1992 thawed canine spermatozoa for transcervical insemination. **Journal of**
1993 **Reproduction and Development**, vol. 61, 2015.
- 1994 OLIVEIRA, R.A.; WOLF, C.A.; VIU, M.A.O.; GAMBARINI, M.L. Addition of
1995 Glutathione to an Extender for Frozen Equine Semen. **Journal of Equine**
1996 **Veterinary Science**, v. 33, p. 1148–1152, 2013.
- 1997 OLSON, S.E.; SEIDEL, JR G.E. Culture of in vitro-produced bovine embryos with
1998 Vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. **Biol**
1999 **Reprod**, v.62, p.248-252, 2000.
- 2000 OTANI, H.; TANAKA O.; KASAI, K.; YOSHIOKA, T. Development of
2001 mitochondrial helical sheath in the middle piece of the mouse spermatid tail:
2002 Regular dispositions and synchronized changes. **Anat Rec**, v 222, p. 26–33, 1988.
- 2003 ORTEGA, A.M; IZQUIERDO, A.C; GÓMEZ, J.J.H.; OLIVARES- CORICH,I
2004 I.M.; TORRES, V.M.M.; MÉNDEZ, J.J.V. Peroxidación lipídica y antioxidantes en
2005 la preservación de semen. Una revisión. **Interciencia**, v.28, p.699-704, 2003.
- 2006 PAP, E. H. W.; DRUMMEN, G. P. C.; WINTER, V. J.; WINTER, V. J.; KOOIJ, T.
2007 W.; RIJKEN, P.; WIRTZ, K. W.; OP DEN KAMP, J. A.; HAGE, W. J.; POST, J. A.
2008 Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11--
2009 BODIPY. **Febs Letters**, v. 453, p. 278–282, 1999.
- 2010 PARTYKA, A.; LUKAASZEWICZ, E.; WOJCIECH, N.; TWARDON, J. Detection
2011 of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C11-BODIPY.
2012 **Theriogenology**, v. 75, p. 1623–1629, 2011.
- 2013 PASTORE, A.A.; TONIOLLO, G. H.; LÔBO, R. B.; FERNADES, M.B.; VOZZI,
2014 P.A.; VILA, R.A.; GALERANI, M. A. V.; ELIAS, F.P.; CARDILLI, D.J.
2015 características biométricas, testiculares, seminais e parâmetros genéticos de touros
2016 pertencentes ao programa de melhoramento genético da raça nelore. **Ars**
2017 **veterinaria**, v.24, p.134-141, 2008.
- 2018 PAUDEL, P.; KUMAR, S.; MEUR, S.K.; KAMARESAN, A. Ascorbic acid,
2019 catalase and chlorpromazine reduce cryopreservation-induced damages to crossbred
2020 bull spermatozoa. **Reproduction Animal Domestic**, v. 45, p. 256-252, 2010.
- 2021 PEEKER, R.; ABRAMSSON, L.; MARKLUND, S.L. Superoxide dismutase
2022 isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. **Molecular Human**
2023 **Reproduction**, v. 3, p. 1061–1066, 1997.
- 2024 PEGG, D.E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in**
2025 **Reproductive Medicine**, v.20, n.1, p.05- 14, 2002.
- 2026 PEIXOTO, A.L.V.A.; MONTEIRO, P.L.J.; CAMARA, D.R.; VALENÇA, R.M.B.;
2027 SILVA, K.M.G.; GUERRA, M.M.P. Efeito do tempo de incubação pós-
2028 descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com
2029 tris-gema suplementado com vitamina c e trolox. **Ciênc. Vet. Tróp**, v. 11, p. 16 -
2030 24, 2008.
- 2031 PEIXOTO, P.C.V.A.; COLETO, Z.E.; MOURA, C.S.; ALMEIDA, F.C.; SOARES,
2032 P.C.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeito da adição de trolox e glutatona

- 2033 reduzida na viabilidade in vitro de espermatozoides de cães. **Cienc. anim. Bras**,
2034 v.14, p. 436-447, 2013.
- 2035 PEÑA, F.J., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., MARTINEZ H. R.
2036 Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and
2037 mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of
2038 the ejaculate. **Animal Reproduction Science**. 78 85–98, 2003.
- 2039 PEÑA, F.J; SARAIVA, F.; JOHANNISSON, A.; WALGREN, M.; RODRIGUEZ;
2040 MARTINEZ, H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in
2041 frozen thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.28, p. 107
2042 – 114, 2005.
- 2043 PEÑA, F.J.; GARCÍA, M.; SAMPER, J.C.; APARICIO, I.M.; TAPIA, J.A.;
2044 FERRUSOLA, C.O. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The
2045 way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology**, v. 76, p.
2046 1177–1186, 2011.
- 2047 PERIS, S.I; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram
2048 semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological
2049 parameters and the sperm chromatin structure assay. **J Androl**, v.25, p. 224-233,
2050 2004.
- 2051 PEREZ, E.G.; NICHI, M.; VIANA, C.H.; SILVA, R.O.C.; DALMAZZO, A.;
2052 GOÉS, P.A.; GURGEL, J.R.C.; BERNABE, V.H.; BERNABE, R.C. Efeito da
2053 adição de glutathione na função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado.
2054 **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 49, p. 262-268, 2012.
- 2055 PESSOA, J.S.; GARCIA, A.R.; NAHÚM, B.S.; CASTRO, S.B.S.; SANTOS, A.X.
2056 Avaliação da fertilidade a campo de sêmen bubalino congelado com antioxidantes:
2057 resultados preliminares para inseminação artificial em tempo fixo. Resumo
2058 expandido apresentando no 15º Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA,
2059 2011.
- 2060 PICKET, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of sêmen. IN: McKinnon, A.
2061 Equine Reproduction, Cap. 83, p. 769-782, 1992.
- 2062 PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant**
2063 **Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.
- 2064 PHILLIPS, P.H. The preservation of bull semen. **J. Bio. Chem.**, v. 130, p.415,
2065 1939.
- 2066 REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine
2067 as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v. 30,
2068 p. 4480–4486,1991.
- 2069 SAGARA, J.; MIURA, K.; BANNAY, S. Cystine uptake and glutathione level in
2070 fetal brain cells in primary cultura and in suspension. *Journal of Neurochemistry*,
2071 v.61, p.1667- 1671, 1993.
- 2072 SALAMON, S, MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim Reprod Sci**,
2073 v.62, p.77-111, 2000.

- 2074 SARREIRO, L.C. Herdabilidade e correlação genética entre perímetro escrotal,
2075 libido e características seminais de touros Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina**
2076 **Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n.6, 2002.
- 2077 SATORRE, M.M.; BREININGER, E.; BECONI, M.T.; BEORLEGUI, N.B. α -
2078 Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of
2079 cryopreserved porcine sperm. **Theriogenology**, v.68, p.958-965, 2007.
- 2080 SEVERO, N.C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a
2081 fertilidade. **Hora Vet**, v.28, p.36-39, 2009.
- 2082 SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as
2083 antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition, Bethesda**, v.62, p.1315-
2084 1321, 1995.
- 2085 SILVA, P. F.N.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B.A.J.
2086 Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental
2087 competence of the embryo after the first cleavage. **Theriogenology**, v. 67, p.
2088 609–619, 2007.
- 2089 SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J.
2090 F.; PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. P. In vitro and in vivo evaluation of ram
2091 sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and
2092 reduced glutathione. **Reproduction in Domestic Animals, Linköping**, v. 46, p.
2093 874-881, 2011.
- 2094 SILVA, J. D. Análise mercadológica de embriões zebuínos produzidos a partir da
2095 técnica de fertilização in vitro – fiv. Boletim técnico, 2011b.
- 2096 SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Terapias antioxidantes na criopreservação
2097 espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, v.111, p. 143-149,
2098 2012.
- 2099 SOARES, A.T.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F. C.; LEMOS, P.F.B.A.; NUNES, J.F.;
2100 PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P. Espermatozoides caprinos criopreservados em
2101 meio à base de leite desnatado acrescido de glutathione reduzida. **Ciência Rural**,
2102 v.41, n.11, 2011.
- 2103 SMILEY, S.T.; REERS, M.; MOTTOLA-HARTSHORN, C.; LIN, M.; CHEN, A.;
2104 SMITH, T.W.; STEELE, G.D.J.R.; CHEN, L.B. Intracellular heterogeneity in
2105 mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic
2106 cation JC-1. **Cell Biol**, v.88, p.3671-3675, 1991.
- 2107 SMITH, B.A.; BRINK, J.S.; RICHARDSON, G.V. Relationships of sire scrotal
2108 circumference to offspring reproduction and growth, **J. Anim. Sci**, v.67, p. 2881-
2109 2885, 1989.
- 2110 SNOECK, P.P.N; MOURA, L.C.O; CLEMENTE, C.A.A.; ECHEVERRIA,M.L.;
2111 NEVES, M.M.; ALLAMAN, I.B.; HENRY, M. Effect of catalase, superoxide
2112 dismutase and reduced glutathione in LDL extender on ovine cryopreserved sperm
2113 viability. **Ciências Agrárias**, v.36, p. 2593- 2602, 2015.

- 2114 STANDERHOLEN, F.D.; MYROMSLIEN, E.; KOMMISRUUD, E.; ROPSTAD,
2115 K.E.; WATERHOUSE. Comparison of electronic volume and forward scatter
2116 principles of cell selection using flow cytometry for the evaluation of acrosome and
2117 plasma membrane integrity of bull spermatozoa. **Cytometry A**, v.85, p. 719–728,
2118 2014.
- 2119 SBTE. Sociedade brasileira de tecnologia de embriões, **Revista o embrião**, edição
2120 55, 2015.
- 2121 SCARPA, M.; STEVANATO, R.; VIGLINO, P.; RIGO, A. Superoxide ion as
2122 active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecular oxygen. Effect of
2123 superoxide dismutase. **J. Biol. Chem**, v. 258, p. 6695-7, 1984.
- 2124 SCHAFER, O.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed
2125 through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical**
2126 **biology and Medicine**, v. 30, p 1191- 1212, 2001.
- 2127 SCHNEIDER, C.D; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício:
2128 mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**, v.10(10),
2129 p.308-13, 2004.
- 2130 SCHRECK, P.; BAUERLE, P.A. A role of oxygen radicals as second messengers.
2131 **Trends Cell Biol**, v. 1, p.39-42,1991.
- 2132 SCHROEDER, C. P.; GODWIN, A.K.; O'DWYER, P.J; TEW, K.D.; HAMILTON,
2133 T.C; OZOLS, R.F. Glutathione and drug resistance. **Cancer Invest.**, n. 14, p. 158-
2134 168, 1996.
- 2135 ŚCIBIOR, D.; CZECZOT, H. Arginina – metabolizm i funkcje w organizmie
2136 człowieka. **Post. Hig. Med. Dośw**, v. 58, p. 321–332, 2004.
- 2137 SHAN, X. Q.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative
2138 injury. **Pharmacol Ther**, v. 47, p. 61-71, 1990.
- 2139 SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted
2140 reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.
- 2141 SIQUEIRA, JB, GUIMARÃES, JB, COSTA, EP, HENRY, M, TORRES, AA,
2142 SILVA, MVGB & SILVEIRA TS. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino
2143 congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **R. Bras. Zootec.**, 36:387- 395,
2144 2007.
- 2145 TALMWAR, P.; HAYATNAGAR, S. Sperm fuction test. **Journal of Human**
2146 **Reproductive Science**, v.8, p. 61 – 69, 2015.
- 2147 TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.;
2148 LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.;
2149 SUGINO, N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **J Ovarian Res**,
2150 v.5, p.1757-2215, 2012.
- 2151 TILLY, J.L.; TILLY, K.I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle
2152 stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles.
2153 **Endocrinology**, v.136, p.242-252, 1995.

- 2154 TURCER, P.B.; BUCAK, M. N.; BUYULEBLECI, S.; SARIOZKAN, S.; YENI,
2155 D.; EKEN, A.; AKALIN, P.P.; KINET, H.; AVDATEK, F.; FIDAN, F.;
2156 GUNDOGMAN, M. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative
2157 stress parameters of post-thawed bull semen. **Cryobiology**, v. 61, p. 303–307, 2010.
- 2158 THIELE, J.J.; FREISLEBEN, H.J.; FUCHS, J.; OCHSENDORF, F.R. Ascorbic
2159 acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationship with
2160 chemiluminescence in washed semen. **Hum. Reprod.**, v. 10, p. 110–115, 1995.
- 2161 THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Effect
2162 of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined
2163 by flow cytometry. **Biol Reprod**, v. 58, p. 786–793, 1998.
- 2164 URSINI, F.; HEIM, S.; KIESS, M.; MAJORINO, M.; ROVERI, A.; WISSING, J.;
2165 FLOHE, L. Dual of the selenoprotein PHGPx during maturation. **Science**, v.285, p.
2166 1393 – 1396, 1999.
- 2167 VAISBERG, C.N.; JELEZARSKY, L.V.; DISHLIANOVA, B.; JELEZARSKY,
2168 L.V.; DISHLIANOVA, B.; CHAUSHEV, T.A. Activity, substrate detection and
2169 immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs
2170 and semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 416-28, 2005.
- 2171 VALE FILHO, V.R. Padrões de sêmen bovino, para o Brasil. Análise e sugestões.
2172 In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8, 1989, Belo
2173 Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, p.94-118, 1989.
- 2174 VALENÇA, R.M.B; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a
2175 utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira**
2176 **de Reprodução Animal**, v.31, p.47-53, 2007.
- 2177
2178 VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.;
2179 MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de
2180 oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue
2181 humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.
2182 30, p. 1323-1328, 2007.
- 2183 VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted sêmen
2184 analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57,
2185 p.149-179, 2002.
- 2186 VIJATAYPRASAD, S.; GHONGANE, B.B.; NAYAK, B.B. Effect of Vitamin C
2187 on Male Fertility in Rats Subjected to Forced Swimming Stress. **Journal of Clinical**
2188 **and Diagnostic Reserch**, v. 8, p. 05-08, 2014.
- 2189 WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of
2190 spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction and**
2191 **Fertility Devices**. v.7, p.871–891, 1995.
- 2192 WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**
2193 **Reproduction Science**, v. 60–61 P. 481–492, 2000.

- 2194 WATANABE, Y.F.; WATANABE, M.R.; VILA, R.A.; GALERANI, M.A.V.; LÔB
2195 O,R.B. Seleção de touros para a produção in vitro de embriões. **Arq. Fac. Vet.** v.26,
2196 n.1, p.388-389, 1998.
- 2197 WELCH, R.W.; WANG, Y.; CROSSMAN, A.J.; PARK, J.B.; KIRK, K.L.;
2198 LEVINE, M. Accumulation of vitamin C (ascorbate) and its oxidized metabolite
2199 dehydroascorbic acid occurs by separate mechanisms. **J. Biol. Chem**, v. 270, p.
2200 12584-2, 1995.
- 2201 WOJCIK, C.; SAWICKI, W.; MARIANOWISK, P.; BENCHAIIB, M.; CZYBA,
2202 J.C.; GUERIN, J.F. Cyclodextrin enhances spermicidal effects of magainin-2-
2203 amide. **Contraception**, v. 62, p. 99-103, 2000.
- 2204 WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R.; LADHA, S.; LAMES, R.
2205 Regionalized Lipid Diffusion in the Plasma Membrane of Mammalian Spermatozoa.
2206 **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1506–1514, 1998.
- 2207 WHITAKER, B.D.; KNIGHT, J.W. Exogenous γ - glutamyl cycle compounds
2208 supplemented to in vitro maturation medium influence in vitro fertilization, culture,
2209 and viability of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology*, v. 62, p.311-322,
2210 2004.
- 2211 YOSHIDA, M. Conservation of sperm current status and new triends. **Animal**
2212 **Reproduction Science**, v. 60-61, p. 349-355, 2000.
- 2213 ZÚCCARI, C.E.S.N.; LEITE, P.A.; PASSOS, T.S.; CARRIJO, P.S.; KIEFER, C.
2214 Correlação entre métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática do
2215 espermatozoide bovino criopreservado. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.10, p 678-
2216 684, 2009.
- 2217 ZHAO, X. L; CAO, S.; HU, J.H.; WANG, W.H.; HAO, R.J.; GUI, L.S.; ZAN, L.S.
2218 Protective effects of ascorbic acid and vitamin E on antioxidant enzyme activity of
2219 freeze-thawed semen of Qinchuan bulls. **Genetic and Molecular Research**, v. 1, p.
2220 2572 – 2581, 2015.
- 2221
- 2222
- 2223
- 2224
- 2225
- 2226
- 2227
- 2228
- 2229

2230

ANEXO 1

2231

Solução Tris:

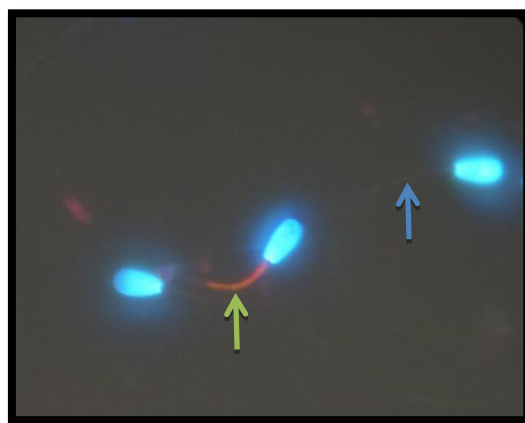
Componente	Quantidade
TRIS	36,05 g
ÁCIDO CÍTRICO	20,24 g
FRUTOSE	14,88 g
PENICILINA G	500.000 UI
ESTREPTOMICINA	500.000 µg
ÁGUA MILLIQ/DESTILADA q.s.p	1000 mL

2232

(Gonzalez, 2004)

2233

2234



2235

2236 **Espermatozoide corados com CellRox®. Seta verde: Intenso estresse oxidativo; Seta**
2237 **azul: Sem estresse oxidativo. Pinto, 2015.**

2238

2239

2240

2241

2242

2243

ANEXO 2

2244

1. Solução TALP SPERM(Bavister et al., 1983)

Componentes	Quantidade (g) para preparar 500 mL
NaCl	2,1 g
KCl	0,935 g
NaHCO ₃	1,05 g
NaH ₂ PO ₄	0,025 g
CaCl ₂ H ₂ O	0,145 g
MgCl 6H ₂ O	0,04 g
Hepes	3,25 g

2245

2246 Preparo:

2247 - Diluir CaCl₂ 2H₂O e MgCl 6H₂O em 200 mL de água Milli-Q;

2248 - Os demais sais devem ser diluídos em 200 mL de água Milli-Q;

2249 - Combinar as duas soluções e completar para 500 mL;

2250 - Filtrar;

2251 - Manter resfriado.

2252

2253

2. Solução dos metabólitos glicosados

2254

2255

A. Solução estoque

2256

Componentes	Quantidade (g) para preparar 500 mL
Glicose	2,5 g
Lactato de sódio	9,25 mL
Piruvato de sódio	70 mg
Pen-Strep	12,5 mL

2257

2258 Preparo:

2259 - Dissolver todos os componentes;

2260 - Aliquotar - alíquotas de 5 mL;

2261 - Manter em freezer (-20° C).

2262

2263

B. Solução trabalho

2264 - Pipetar 45 mL da solução de sais de TALP;

2265 - Ajustar pH para 7,4;

2266 - Adicionar 5mL da solução estoque de metabólitos glicosados;

2267 - Filtrar em filtro de 0,45 µm;

2268 - Aliquotar - alíquotas de 300 µL;

2269 - Manter em freezer (-20° C).

2270 **Sondas fluorescentes (Celeghini et al, 2007)**

2271 **Hoescht 33342**

2272

2273 Solução estoque (25 mg/mL)

2274

2275 - Diluir o Hoescht 100mg em 4mL de DMSO - 25mg/mL (solução estoque);

2276 -Aliquotar em eppendorff e armazenar a -20° C.

2277

2278 Solução de trabalho (0,5 mg/mL)

2279

2280 - Adicionar a 980 µl de DPBS, 20 µl de H3342 (solução estoque, 25 mg/mL) para ficar
2281 a concentração de 0,5 mg/mL (solução trabalho);

2282 -Aliquotar em eppendorff e armazenar a -20° C.

2283 **Iodeto de propídeo (PI)**

2284

2285 Solução estoque 25 mg/mL

2286

2287 - Adicionar 1 mL de DMSO à 25 mg de PI;

2288 -Aliquotar em eppendorff e armazenar a -20° C.

2289 Solução trabalho 0,5 mg/mL

2290 - Adicionar 20 µL de PI (solução estoque) a 980 µL de PBS;

2291 - Aliquotar em eppendorff e armazenar a -20° C.

2292 **FITC-PSA**

2293

2294 Solução de trabalho (100 µg/mL)

2295

2296 - No frasco do FITC-PSA acrescentar 1 mL de DPBS e homogeneizar;

2297 - Em tubo falcon coberto com papel alumínio adicionar 18 mL de DPBS, 1 mL de
2298 solução de azida de sódio 1% e 1 mL da solução do FITC-PSA homogeneizada;

2299 - Aliquotar em eppendorff e armazenar a -20° C.

2300 **CellRox®**

2301 Solução de trabalho (1mM)

2302

2303 - Adicionar 8 µL de CellROX® 2,5 mM a 12 µL de DMSO;

2304 - Armazenar a -20° C.