

## Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno<sup>1</sup>

*Reactive Oxygen Species (ROS) and the use of antioxidants on the boar semen cryopreservation*

Rômulo Menna Barreto Valença<sup>2,4</sup>, Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>3</sup>

<sup>2</sup>Clínica Escola Veterinária FEJAL-CESMAC, Marechal Deodoro, AL, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, PE, Brasil

<sup>4</sup>Correspondência: [rmbvalenca@ig.com.br](mailto:rmbvalenca@ig.com.br)

### Resumo

Os problemas relacionados à criopreservação do sêmen de reprodutores suínos estão relacionados, principalmente, à conformação da membrana plasmática destes espermatozoides. Sua composição lipídica, representada, em sua maioria, por ácidos graxos polinsaturados, confere à membrana uma grande fluidez devido à quantidade de duplas ligações ou ligações insaturadas existentes. O espermatozoide é um organismo aeróbio, sendo o oxigênio um elemento essencial para manutenção de suas funções. Porém, este elemento pode ocasionar sérios danos à célula espermática, caso esteja presente em elevadas concentrações, o que ocorre, por exemplo, quando da elevada elaboração de (ROS) espécies reativas ao oxigênio. Os efeitos desta reação incluem perda de motilidade, de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões no DNA espermático e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fertilizante do espermatozoide. O efeito oxidativo ocasionado pela geração de (ROS) seria diminuído através da presença de substâncias antioxidantes ao plasma seminal ou através de sua adição aos diluentes utilizados na refrigeração e, principalmente, na congelação do ejaculado. Existem relatos referentes a ejaculados que apresentaram elevados índices de viabilidade espermática, tanto antes quanto após a congelação, os quais possuíam alta atividade de antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase selênio dependente (GSP-Pe-Se), assim como de antioxidantes não enzimáticos, como a glutatona reduzida e a vitamina E. A elaboração de protocolos de congelação deve considerar a quantificação de ROS geradas e a identificação das substâncias que possam atuar na proteção das células espermáticas aos efeitos oxidativos ocorridos na criopreservação do sêmen.

**Palavras-chave:** antioxidantes, criopreservação, sêmen, varrões.

### Abstract

*The problems related to the cryopreservation of the boar semen are related, mainly, to the conformation of the sperm membrane. Its lipid composition, represented, in its majority, for polyunsaturated fatty acids, confers to the membrane a great fluidity due to amount of double bonds or existing unsaturated bonds. The spermatozoon is an aerobic organism, being the oxygen an essential element for maintenance of its functions. However, this element can cause serious damages to the sperm cell, in case that present in it is high concentrations, what it occurs, for example, when of the increase elaboration of reactive oxygen species (ROS). The effect of this reaction include loss of motility, of irreversible form, inhibition of respiration, injuries in the sperm DNA and loss of intracellular enzymes, intervening with the fertilizing capacity of the spermatozoon. The oxidative effect caused by the generation of (ROS) would be diminished through the presence of antioxidants substances to the seminal plasm or through its addition to the extenders used in the cooling and, mainly, the freezing of the ejaculate. Recently, it has been shown that semen samples with highest viability after freezing and thawing were also characterized by high activity of enzymatic antioxidants substances, as superoxide dismutase (SOD) and selenium-dependent glutathione peroxidase (GSP-Pe-Se), as well as of not enzymatic antioxidant substances, as glutathione reduced and vitamin E. The elaboration of cryopreserv protocols must consider to the quantification of generated ROS and the identification of the substances that can act in the protection of the sperm cells to the oxidative effect occurrences in the cryopreserv of the semen.*

**Keywords:** antioxidants, cryopreserv, semen, boars.

### Introdução

O armazenamento do sêmen de reprodutores suínos através da congelação é altamente importante para a manutenção de um banco de germoplasma, preservação de uma diversidade genética e melhoramento genético da espécie. Todavia, o espermatozoide suíno é mais sensível aos eventos relacionados à criopreservação do que

<sup>1</sup>Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

os gametas das espécies bovina e humana, por exemplo. Estes efeitos estão relacionados à agressão sobre a membrana plasmática e outras organelas celulares, ocasionados pelo estresse oxidativo, choque térmico e formação de cristais de gelo intracelulares (Guthrie e Welch, 2005). Sendo assim, a sobrevivência das células espermáticas suínas após os protocolos de congelação é de, aproximadamente, 50% do número total de células viáveis do ejaculado (Watson, 1995), determinando redução de até três leitões nascidos por parto (Jonson, 1998), o que impossibilita sua utilização em níveis comerciais.

A variação da composição dos lipídios que estão presentes na membrana plasmática do espermatozóide tem sido considerada um fator importante para a viabilidade do ejaculado submetido aos processos de criopreservação (Parks e Linch, 1992). Nas diferentes espécies de mamíferos, mais de 60% dos lipídios presentes na membrana plasmática são ácidos graxos polinsaturados, o que confere à membrana uma grande fluidez devido à quantidade de duplas ligações ou ligações insaturadas existentes.

Sendo o espermatozóide um organismo aeróbio, o oxigênio torna-se um elemento essencial para manutenção de suas funções. Porém, este elemento pode ocasionar sérios danos à célula espermática, caso esteja presente em elevadas concentrações, o que ocorre, por exemplo, quando da elevada elaboração de (ROS) espécies reativas ao oxigênio (Ortega *et al.*, 2003). Estudos mais recentes têm demonstrado que o espermatozóide e os leucócitos presentes no sêmen são capazes de gerar ROS (Espécies Reativas ao Oxigênio) e que os danos causados na célula espermática advêm de uma alta quantidade de ácidos graxos polinsaturados presentes na sua membrana plasmática. A elevada percentagem destes elementos, torna-os vulneráveis à atuação de agentes oxidantes, como os radicais livres, e desse modo, sensíveis à peroxidação lipídica, causando perda de função e morte espermática (Bilodeu *et al.*, 2002).

O efeito oxidativo ocasionado pela geração de (ROS) seria diminuído através da presença de substâncias antioxidantes ao plasma seminal ou através de sua adição aos diluentes utilizados na refrigeração e, principalmente, na congelação do ejaculado. Porém, os trabalhos têm demonstrado resultados contraditórios referentes à esta atuação sobre a preservação da viabilidade da célula espermática no sêmen fresco e congelado, inclusive na espécie humana, em virtude da divergência do tipo e da concentração do antioxidante utilizado, assim como seu mecanismo de ação específico referente à proteção de célula espermática (Donnelly *et al.*, 1999).

### **Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS)**

O efeito prejudicial das espécies reativas ao oxigênio (ROS) sobre o espermatozóide foi sugerido por Macleod (1943), o qual demonstrou que a exposição do espermatozóide humano a altas concentrações de oxigênio resultou em toxicidade, com perda de sua motilidade devido à ocorrência da peroxidação lipídica. Os efeitos desta reação incluem perda de motilidade, de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões no DNA espermático e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fertilizante do espermatozóide (White, 1993).

As células espermáticas são sensíveis a lesões peroxidativas devido à grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados em sua membrana. Estas lesões induzem a geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS), grandes responsáveis por danos na viabilidade e fertilidade de espermatozóides (Alvarez e Moraes, 2006).

O elemento oxigênio (O) pode ser considerado um radical livre, já que apresenta desemparelhamento de elétrons na sua última camada eletrônica, conferindo a ele uma alta reatividade (Halliwell e Gutteridge, 1999). As ROS ou espécies reativas ao oxigênio incluem todos os radicais derivados do oxigênio e encontrados em todos os sistemas biológicos.

Segundo Nordberg e Arner (2001), em condições fisiológicas, o  $O_2$  sofre uma redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando em formação de água. Durante esta reação são elaborados reativos intermediários como os radicais superóxido ( $O_2^-$ ), hidroperoxila ( $HO_2$ ) e hidroxila (OH). Além destes, temos o não radical, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

O radical superóxido é um radical livre formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente, na membrana mitocondrial através da cadeia respiratória. É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar em membranas lipídicas, agindo apenas no compartimento onde é produzido. O radical hidroxila é considerado o mais reativo em sistemas biológicos e é formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais ( $Fe^{++}$  ou  $Cu^{++}$ ), denominada de reação de Fenton. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é extremamente danoso, pois tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas. Uma vez produzido, o  $H_2O_2$  é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes como a catalase, a glutatona peroxidase e peroxiredutases (Nordberg e Arner, 2001).

### **Efeitos da criopreservação sobre a atividade mitocondrial de espermatozóides suínos**

Para Cummins *et al.* (1994), o efeito da oxidação sobre o DNA mitocondrial, assim como sobre a

arquitetura da membrana espermática pode ser considerado o principal fator de redução da motilidade espermática e fertilidade do sêmen criopreservado. Para estes autores, a mitocôndria que se localiza na peça intermediária do espermatozóide é responsável pela geração de energia, a qual fornece o suporte para a motilidade espermática. Dessa forma, o potencial de viabilidade da membrana mitocondrial pode ser um importante indicador de sua integridade funcional.

A substância lipofílica 5,5',6,6'tetracloro-1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolil carbocianine iodine, conhecida como JC-1, é a única forma de avaliação do baixo ou alto potencial de atividade da membrana mitocondrial. Em mitocôndrias com alto potencial de membrana, o JC-1 forma múltiplos aglomerados de coloração laranja, com comprimento de 590 nm, e quando excitadas, 488 nm. Nas mitocôndrias com baixo potencial de membrana, o JC-1 forma monômeros de coloração verde, medindo entre 525 e 530 nm, e quando excitadas atingem 488 nm. A avaliação do potencial da membrana mitocondrial utilizando JC-1 tem sido utilizada em ejaculados de bovinos (Garner *et al.*, 1997), eqüinos (Gravance *et al.*, 2000), ratos (Gravance *et al.*, 2001), humanos (Troiano *et al.*, 1998) e suínos (Jun-Huo *et al.*, 2002).

O método citométrico, o qual se utiliza a fluorescência para a avaliação *in vitro* do sêmen fresco e refrigerado, é acurado e capaz de detectar pequenas diferenças entre as amostras, possuindo alta fidelidade estatística (Peña, 2000). Fato este, demonstrado através da utilização deste método em experimentos que utilizaram  $\alpha$ -tocoferol, visando prevenir o efeito oxidativo sobre espermatozóides de reprodutores suínos mantidos no estado líquido (Ceroline *et al.*, 2000).

Do mesmo modo, a citometria de fluxo tem sido utilizada em pesquisas relatando a adição de antioxidantes para melhoria da viabilidade espermática em amostras de sêmen líquido de suínos (Ceroline *et al.*, 2000), refrigerado de eqüinos (Ball *et al.*, 2001) e congelado de bovinos (Beeoni *et al.*, 1993), ovinos (Maxwell e Stojanov, 1996), aves (Donoghue e Donoghue, 1997) e homem (Askari *et al.*, 1994).

Segundo Peña *et al.* (2003b), a manutenção funcional das mitocôndrias de espermatozóides suínos dependeu do efeito protetor dos antioxidantes adicionados ao sêmen antes da congelação. Tanto a fração pobre em espermatozóides quanto a fração rica sofreram grande redução do potencial de viabilidade mitocondrial, influenciando diretamente na motilidade espermática, avaliada subjetivamente, assim como através da técnica computadorizada (CASA).

O tempo de refrigeração das doses diluídas de sêmen suíno, juntamente com a adição de antioxidantes aos ejaculados diluídos, têm sido evidenciados como procedimentos que podem auxiliar na tolerância das células espermáticas à criopreservação, em virtude de muitos trabalhos terem relatado que a injúria causada pelos agentes oxidantes são maiores após a congelação. Entretanto, os poucos trabalhos realizados nesta área demonstram resultados contraditórios relacionados aos diferentes índices de susceptibilidade à peroxidação lipídica entre as diversas espécies, associado aos tipos de antioxidantes utilizados e à composição do plasma seminal.

### Utilização de antioxidantes e seus efeitos sobre a qualidade espermática de reprodutores suínos

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm sido realizadas relatando os efeitos do estresse oxidativo sobre a célula espermática, especialmente no sêmen de humanos (Aitken e Krauz, 2001). No sêmen de reprodutores suínos tem-se observado, especialmente, grande atuação dos peróxidos sobre as células espermáticas, devido à elevada existência de ácidos graxos polinsaturados e fosfolipídios em sua membrana (Ceroline *et al.*, 2000), assim como baixa capacidade antioxidante do plasma seminal de suínos (Brezinska-Slevbodsinska *et al.*, 1995).

Atualmente, já é aceito que a criopreservação induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que diminuem a performance espermática (Watson, 2000). Porém, Jones e Mann (1977) já descreviam que o processo de peroxidação induz alterações estruturais rápidas e irreversíveis nos espermatozóides, com perda de motilidade, alterações no seu metabolismo e descontrole no trânsito de componentes intra e extra-celulares através da membrana.

Os mecanismos de defesa antioxidante presentes no plasma seminal e na célula espermática incluem sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático compreende enzimas como a superóxido dismutase, a glutathione redutase, glutathione peroxidase e catalase. Esta enzima atua como catalisadora na reação de redução do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular. Seu papel antioxidante diminui o risco de formação do radical hidroxila a partir do  $H_2O_2$  via reação de Fenton. Os antioxidantes não enzimáticos incluem a glutathione reduzida (GSH), o urato, o ácido ascórbico, a vitamina E, a taurina, a hipotaurina, os carotenóides e ubiquinonas (Coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (Nordberg e Arnér, 2001).

Para Ferreira e Matsubara, (1997) esses sistemas podem atuar em duas direções: como removedor do agente oxidante antes que ele ocasione lesão celular (glutathione reduzida – GSH; superóxido dismutase – SOD; catalase; glutathione peroxidase – GP e a vitamina E), ou ainda como agente reparador da lesão já ocorrida (ácido ascórbico; glutathione redutase – GR e glutathione peroxidase – GPx). Em sua maioria, estes elementos antioxidantes encontram-se no meio intracelular, excluindo-se apenas a vitamina E, que também é constituinte

estrutural da membrana espermática.

Para Halliwell e Gutteridge (1999) a vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante. Atua na redução de moléculas oxidativas como os peróxidos, prevenindo a elaboração de hidroperóxidos de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo as células espermáticas de danos oxidativos. Porém, quando ingerida em doses elevadas ou na presença de metais como ferro ou cobre, pode atuar como um pró-oxidante levando a lipoperoxidação. A mistura de Cu-ascorbato ou Fe-ascorbato estimulam os danos oxidativos levando à formação de radicais livres que danificam o ácido desoxirribonucleico (ADN), lipídios e proteínas.

Recentemente, tem sido relatado que ejaculados que apresentaram elevados índices de viabilidade espermática, tanto antes quanto após a congelação, também possuíam alta atividade de enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona peroxidase selênio dependente (GSP-Pe-Se) (Ceroline *et al.*, 2000). A glutatona peroxidase (GPx) é uma enzima antioxidante que contém selênio em sua composição e remove radicais peróxido de vários peróxidos, aumentando assim, a motilidade espermática. Da mesma forma, a glutatona redutase regenera a glutatona reduzida (GSH) de sua forma oxidada (GSSG), com funções já conhecidas no núcleo espermático, assim como na formação de microtúbulos (Griveau e Le Lannou, 1997). Sinhá *et al.* (1996) observaram aumento no percentual de motilidade espermática pós-congelação, após adicionar 5  $\mu$ M de Glutatona ao sêmen de caprinos.

A adição de Vitamina E aos ejaculados tem demonstrado efeitos variados sobre a motilidade espermática, semelhante àquela observada na utilização de seus análogos ( $\alpha$ -tocoferol e Trolox<sup>®</sup>) no sêmen fresco de homens (Donnelly *et al.*, 1999) e de ovinos (Upreti *et al.*, 1997). No sêmen refrigerado de equinos e no sêmen congelado de homens, Ball *et al.* (2001) e Askary *et al.* (1994) observaram, respectivamente, pouco efeito da adição deste antioxidante. O processo de oxidação atua diferentemente entre as estruturas das células espermáticas das diversas espécies. Assim, os efeitos da Vitamina E podem variar com a dose utilizada, pois de acordo com a quantidade de radicais hidroxilas a serem inativados, a Vitamina E poderá ter o efeito antioxidante ou estimular a oxidação (Cao e Cutler, 1997).

Peña *et al.* (2003a) adicionou 100  $\mu$ M ou 200  $\mu$ M de Trolox<sup>®</sup>, análogo da vitamina E, em frações rica e pobre de ejaculados obtidos de reprodutores suínos, constatando aumento significativo ( $P < 0,05$ ) na motilidade espermática das amostras tratadas com antioxidantes, quando comparadas à controle. Observou-se, principalmente, aumento da velocidade espermática e do MIP (movimento individual progressivo), e redução significativa ( $P < 0,05$ ) de espermatozoides apresentando movimento circular e desvio lateral de cabeça. Do mesmo modo, foi observado aumento ( $P < 0,05$ ) no número de espermatozoides demonstrando elevada atividade mitocondrial, quando comparadas às amostras não tratadas com antioxidantes. Os efeitos preventivos da vitamina E sobre os espermatozoides foram maiores nas frações pobres em espermatozoides. Para os autores, isto pode ter ocorrido tanto pela variação da composição do plasma seminal entre as duas frações, quanto pela variação da população espermática.

A glutatona é o maior tiol não protéico dentre os componentes das células dos mamíferos, tendo várias funções como, o transporte de aminoácidos, síntese protéica e de DNA, redução de cadeias de dissulfeto e proteção contra estresse oxidativo.

Em pesquisa realizada por Gadea *et al.* (2004) demonstrou-se uma grande variação estatística ( $p < 0,0001$ ) nos níveis de glutatona (GSH) no plasma seminal de 27 reprodutores suínos, demonstrando grande variação individual entre os machos utilizados. Do mesmo modo, uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) nos níveis de glutatona obtidos no sêmen congelado, quando comparados ao sêmen fresco. Esta redução atingiu níveis de até 32%. A adição de 5  $\mu$ M de glutatona no diluente para congelação não implicou em melhoria nos parâmetros seminais estudados, (motilidade progressiva, integridade de acrossoma e integridade de membrana espermática), assim como na capacidade fertilizante destas células. Foram realizados diferentes protocolos de congelação e não se obteve efeito significativo sobre os parâmetros seminais avaliados. Da mesma forma, os resultados da adição da glutatona em doses de sêmen descongeladas, proporcionou melhora dos parâmetros espermáticos avaliados, demonstrando assim, maior atuação antioxidante da glutatona na recuperação da lesão oxidativa já ocorrida na célula espermática.

Durante o descongelamento ocorre um aumento na elaboração de ROS (Chatterjee, 2001) devido a um acréscimo na síntese de superóxido, o qual está relacionado a uma queda nos níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD) e redução dos níveis de glutatona. Esta, por sua vez, relaciona-se a uma queda de glutatona redutase e aumento na oxidação da glutatona pelo peróxido de hidrogênio. A redução nos níveis de glutatona intracelular e elevação nos níveis de ROS podem desencadear a peroxidação lipídica. A glutatona adicionada ao sêmen descongelado poderia atuar elevando os níveis de glutatona intracelular que iria ser utilizada pela glutatona peroxidase para prevenir a agressão causada pela peroxidação lipídica (Gadea *et al.*, 2004).

#### **Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática em reprodutores suínos**

As propriedades biofísicas e biológicas dos espermatozoides estão intimamente relacionadas com a sua composição molecular. A organização da membrana do espermatozoide segue o modelo descrito por Singer e



Nicholson (1972), o qual demonstra uma dispersão de proteínas dentro de uma membrana que seria formada por uma dupla camada de lipídios. Desse modo, torna-se essencial um profundo conhecimento dos fatores ou substância que possam desestabilizar ou proteger esta membrana para garantia do funcionamento ideal do gameta masculino (Parks e Graham, 1992).

A criopreservação do sêmen suíno não é uma técnica muito simples devido aos extensos danos às células espermáticas. Um levantamento sobre os dois principais ácidos graxos que estão presentes na membrana plasmática do espermatozoide dessa espécie foi realizado por Penny *et al.* (2000) e Rooke *et al.*, (2001), onde observaram a presença de 25% de ácido docosapentanóico (DPA) e 30% de ácido docosahexanóico (DHA). O conhecimento da composição destes lipídios pode contribuir muito para o sucesso da criopreservação do sêmen suíno. Sendo assim, as pesquisas têm se direcionado para o desenvolvimento de diluentes que contenham estes lipídios. A gema de ovo tem sido relatada como um componente que tem causado efeitos benéficos na refrigeração e congelamento dos gametas de reprodutores suínos (Bwanga, 1991). Para Guthrie e Welch (2005), melhores métodos de monitoramento da viabilidade espermática e de sua fertilidade podem ser desenvolvidos investigando-se as reações ocorridas nos espermatozoides durante o armazenamento do sêmen líquido e sua congelamento.

Diluentes comerciais como o Beltsville Thawing Solution (BTS), MRA e Androhep Plus (AP) têm sido utilizados para a manutenção dos ejaculados sob refrigeração a 15 °C como primeiro “step” para criopreservação (Eriksson *et al.*, 2001). A refrigeração do sêmen a 15 °C por três horas foi descrita por Westendorf *et al.* (1975), mas este protocolo tem sofrido alterações de acordo com a necessidade e as técnicas desenvolvidas em diferentes centrais de congelamento de sêmen suíno.

Almlid e Jonson (1988), ao diluírem amostras de sêmen suíno com BTS e AP, e submetendo-as à refrigeração a 15 °C durante 3 a 24 horas com posterior centrifugação e adição de diluente à base de gemalactato, observaram efeito negativo da congelamento sobre os espermatozoides. Os efeitos sobre a integridade da membrana plasmática (IMP) foram altamente significativos ( $P < 0,0001$ ) com 78,0% e 39,0% de viabilidade antes e depois da congelamento, respectivamente. A integridade acrossomal também foi reduzida significativamente ( $P < 0,05$ ) de 80,5% para 41,4% depois da congelamento. Do mesmo modo, os autores constataram efeito altamente significativo ( $P < 0,0001$ ) na motilidade espermática com percentual de 62,7% e 27,0% antes e depois da congelamento, respectivamente. O tempo de pré-congelamento elevado de 3 para 24 horas não interferiu significativamente quando comparadas às amostras de sêmen submetidas aos diferentes protocolos de pré-congelamento.

Estes resultados divergem daqueles encontrados por Eriksson *et al.* (2001) que, ao elevar o tempo de pré-congelamento de 3 para 10 e depois para 20 horas, obtiveram aumento da integridade acrossomal nos espermatozoides pós-congelamento e decréscimo da motilidade pós-congelamento em ejaculados diluídos com BTS submetidos a maior tempo de refrigeração a 15 °C.

A variação de fluidez da membrana plasmática dos espermatozoides ocorrida durante o período de refrigeração, exerce influência sobre a viabilidade da célula espermática devido ao contato dos constituintes do plasma seminal e dos componentes dos diluentes com os lipídios presentes na superfície da membrana plasmática dos espermatozoides (Pettit e Buhr, 1998). Desse modo, procura-se através de pesquisas os caminhos a serem seguidos para a obtenção de maior viabilidade espermática frente aos protocolos de criopreservação.

### Considerações finais

Torna-se de fundamental importância a utilização de métodos eficazes de análise da viabilidade de células espermáticas, visando detectar, *in vitro*, a previsibilidade da capacidade fertilizante antes de sua utilização em programas de IA. Alguns estudos têm sido conduzidos no Laboratório de Andrologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE visando identificar qual o tipo de diluente ideal e quais os benefícios da adição de antioxidantes que propiciem menor estresse oxidativo, danos espermáticos e, conseqüentemente, determinem melhor preservação da capacidade fecundante dessas células nas diversas espécies de animais domésticos.

### Referências

- Alvarez CA, Moraes GV. Efeitos da selenometionina e da vitamina C sobre o sêmen. *Sabiass: Rev Saúde Biol*, v.1, p.42-51, 2006.
- Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, v.122, p.497-506, 2001.
- Almlid T, Jonson LA. effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim Sci*, v.66, p.2899-2905, 1988.
- Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumbe J. effects of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.56, p.577-589, 2001.

- Beeoni MT, Francia CR, Mora NG, Afranchino MA.** effect of natural antioxidants on frozen on bovine semen preservation. *Theriogenology*, v.40, p.841-851, 1993.
- Bilodeu JF, Blanchete S, Cormier N, Sirad MA.** Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, v.57, p.1105-1122, 2002.
- Brezezinska-Stevbodzinska F, Slobodzinski AB, Prietas B, Wiecezorek G.** Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol Trace Elem Res*, v.47, p.69-74, 1995.
- Bwanga CO.** Cryopreservation of boar semen I: a literature review. *Acta Vet Scand*, v.32, p.431-453, 1991.
- Cao G, Cutler RG.** High concentration of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. *Arch Gerontol Geriatr*, v.17, p.189-201, 1997.
- Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Boble R.** Viability susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci*, v.58, p.99-111, 2000.
- Chatterjee S, de Lamirande E, Gragnon C.** Criopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol Reprod Dev*, v.60, p.498-506, 2001.
- Cummins JM, Jequier AM, Kan R.** Molecular biology of the human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress. *Mol Reprod*, v.37, p.345-362, 1994.
- Donnelly FT, McClure N, Lewis SFM.** Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertil Steril*, v.72, p.484-486, 1999.
- Donoghue AM, Donoghue DJ.** effects of water and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during liquid storage. *Poult Sci*, v.76, p.1440-1455, 1997.
- Eriksson, B. M, Vazquez, J. M, Martinez, E. A, Roca, J, Lucas, X, Rodriguez Martinez, H.** Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane, integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.55, p.1503-1605, 2001.
- Francheschi C.** Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp Cell Res*, v.241, p.384-393, 1998.
- Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás M, Romar R, Ruiz S.** Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, v.62, p.290-701, 2004.
- Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, Dejarnette JM, Marshall CF.** Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, v.57, p.1401-1406, 1997.
- Gravance CG, Garner DL, Baumber J, Ball B.** A. assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, v.53, p.1691-1703, 2000.
- Gravance CG, Garner DL, Miller MG, Berger T.** Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod Toxicol*, v.122, p.889-898, 2001.
- Griveau JF, Le Lannou D.** reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*, v.20, p.61-69, 1997.
- Guthrie HD, Welch GR.** Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*, v.63, p.316-410, 2005.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free radicals in biology and medicine*. 3ed. New York: Oxford University Press, 1999. 936p.
- Jones R, Mann T.** Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.50, p.255-260, 1977.
- Jonson LA.** Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. In: International Pig Veterinarians Society (IVIS) Congress, 5<sup>th</sup>, 1998, Birmingham, UK. *Proceedings ... Wiltshire*. IVIS, 1998. p.225-229.
- Jun-Huo L, Hong-Ma X, Ming-Yang Z.** Assessment of sperm viability, mitochondrial activity capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*, v.58, p.1349-1360, 2002.
- Macleod J.** The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol*, v.138, p.512-518, 1943.
- Manzur P.** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, v.16, p.125-142, 1984.
- Maxwell WMC, Stojanov T.** Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev*, v.8, p.1013-1020, 1996.
- Norberg J, Árner ESJ.** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad Biol Med*, v.31, p.1287-1312, 2001.
- Ortega AM, Izquierdo AC, Gómez JJH, Corichi IMO, Torres VMM, Méndez JJV.** Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: una revisión. *Interciencia*, v.28, p.699-704, 2003.
- Parks JE, Lynch DV.** Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v.29, p.255-266, 1992.
- Parks JE, Graham JK.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38,

p.209-222, 1992.

**Peña AI.** *Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen thawed dog semen, and the effects of different dryopreservation methods on post-thaw sperm survival an longevity.* 2000. Thesis (PhD) - Department of Obstetries and Gynaccology, Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala, Sweden, 2000.

**Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H.** Antioxidante supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after Cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.85-98, 2003a.

**Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H.** Assessment of fresh and frozen thawed boar semen using an Annexin V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology*, v.60, p.677-689, 2003b.

**Penny PC, Noble RC, Maldjian A, Cerolini S.** Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. *Pig News Inf*, v.25, p.119-126, 2000.

**Pettit MJ, Buhr MM.** Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behavior during Cryopreservation. *J Cryobiol*, v.19, p.736-746, 1998.

**Rooke JA, Shao CC, Speake BK.** Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction*, v.121, p.315-322, 2001.

**Singer SJ, Nicholson GL.** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, v.175, p.720-731, 1972.

**Sinha MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL.** The effect of glutadione on the motility enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Anim Reprod Sci*, v.41, p.237-243, 1996.

**Troiano L, Granata RM, Cossariza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, Tropea F, Carani C, Upreti GC, Jensen K, Oliver JF, Duganzich R, Munday R, Smith JF.** Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*, v.48, p.269-278, 1997.

**Westendorf P, Richter L, Treu H.** Zur Tiefgefrierung von Ebsperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hulsenberger paillettenverfahren. *Dtsch Tierarzti Wschr*, v.82, p.261-267, 1975.

**Watson PF.** Recent developments and concepts the criopreservation of spermatozoa end assessment of their post thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.971-991, 1995.

**Watson PF.** The causes of reduced fertility of cryiopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.61, p.481-492, 2000.

**White IG.** Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shok and preservation:a review. *Reprod Fertil Dev*, v.5, p.639-658, 1993.