Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.35, n.1, p.33-40, jan./mar. 2011. Disponível em www.cbra.org.br

Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática

Ram semen cooling and criopreservation: damage inherent to technique and influence of medium supplementation with antioxidants at the sperm quality

D.R. Câmara[1,3], M.M.P. Guerra[2]

[1]Doutorando da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Curso de Medicina Veterinária, UFAL, Campus Arapiraca, Polo Viçosa, AL, Brasil
[2]Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, PE, Brasil
[3]Correspondência: diogo@vicosa.ufal.br

Resumo

Apesar dos avanços observados nos últimos anos, a taxa de prenhez após inseminação cervical com sêmen criopreservado tem apresentado resultados insatisfatórios em ovinos. A descoberta de que o estresse oxidativo é capaz de influenciar a qualidade seminal estimulou estudos que visam avaliar o efeito da adição de antioxidantes ao meio diluente, tendo como objetivo final a maior viabilidade do sêmen. Desta forma, objetivou-se com esta revisão descrever os processos envolvidos na produção e detoxificação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) do sêmen ovino.

Palavras-chave: espécies reativas ao oxigênio, estresse oxidativo, lipoperoxidação, ROS.

Abstract

Despite the advances observed in the last years, the pregnancy rate after cervical insemination with cryopreserved semen has show inconsistent or even unsatisfactory results in sheep. The discovery that the processes related to oxidative stress are able to influence semen quality, stimulated studies aiming to evaluate the effect of antioxidant adding to the semen extender, with the ultimate goal of a higher semen viability. This review attempts to describe briefly the processes involved with productions and detoxification of reactive oxygen species (ROS) on ram semen.

Keywords: *lipoperoxidation, oxidative stress, reactive oxygen species, ROS.*

Introdução

O objetivo final do espermatozoide é empreender sucesso na fertilização do ovócito. Para tal, o gameta masculino deve amadurecer no trato genital masculino, deslocar-se através do trato genital feminino, onde deverá sofrer capacitação e reação acrossomal, ligar-se à zona pelúcida do ovócito e nela penetrar e, finalmente, promover a fusão de seu pronúcleo com o feminino. Entretanto, fatores ambientais, fisiológicos e genéticos têm sido responsabilizados pela baixa qualidade espermática e consequente infertilidade (Joyce, 1987, citado por Sikka, 1996).

As células espermáticas apresentam, dentre outras peculiaridades, a propriedade de serem metabolicamente flexíveis em relação à utilização do oxigênio para seu metabolismo, que pode se manter entre aeróbico e anaeróbico em algumas espécies (Cummins et al., 1994). Porém, a utilização do metabolismo oxidativo como principal fonte de energia é capaz de gerar biometabólitos ativos do oxigênio, denominados espécies reativas ao oxigênio (ROS). Dentre eles, pode-se destacar o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$; Baker e Aitken, 2004; Silva, 2006).

Em situações em que há desequilíbrio na concentração de ROS, seja pelo aumento de sua produção ou pela diminuição da atividade de substâncias antioxidantes, pode-se afirmar que o sistema encontra-se no estado de estresse oxidativo (Sikka, 1996). Esta condição pode estar associada ao aumento da ocorrência de danos celulares, com consequente redução da fertilidade (Wang et al., 2003).

Os ácidos graxos poli-insaturados, encontrados em concentrações elevadas na membrana de células espermáticas, são os principais alvos da lipoperoxidação induzida pelas ROS, estando a intensidade desse processo relacionada à regulação da homeostase celular (Lenzi et al., 2002). Os tipos mais comuns de lipoperoxidação são a não enzimática e a enzimática e, na célula espermática, há indícios de que o malonaldeído seja o produto final da lipoperoxidação induzida por íons ferro, resultando em alteração estrutural e funcional das membranas das celulares e das organelas (Sikka, 1996).

Recebido: 5 de abril de 2010
Aceito: 24 de março de 2011

Por outro lado, a produção de ROS pelas células espermáticas é fator importante para os seus processos fisiológicos (Baker e Aitken, 2004), pois, em concentrações reduzidas, elas participam de diversas vias de sinalização celular (Aitikens e Bennetts, 2006) e medeiam funções como capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozoide com o ovócito (Aitken, 1999).

Assim, é importante perceber que uma estreita e balanceada proteção antioxidante nas células espermáticas constitui um desafio durante a maturação e o armazenamento, quando as células devem ser capazes de combater o estresse oxidativo e, ao mesmo tempo, manter a habilidade de produção de ROS para execução de seus processos fisiológicos (Drevet, 2006). Desse modo, objetivou-se com esse trabalho revisar, de forma breve, as lesões induzidas ao espermatozoide ovino durante o processamento e sua relação com as ROS e as substâncias antioxidantes.

Processamento do sêmen

A célula espermática apresenta uma membrana formada por uma incomum estruturação lipídica, organizada em diferentes domínios, a qual, quando exposta a diferentes temperaturas, modifica o estado físico dos lipídios, de acordo com suas características bioquímicas. Embora regiões de fase fluida e fase gel coexistam à temperatura ambiente, o processo de refrigeração favorece a transição da fase fluida para a fase gel, reduzindo a fluidez da membrana (Holt, 2000).

Ollero et al. (1998), ao refrigerarem (5^{o}C) o sêmen de carneiros sem a utilização de diluentes, observaram redução de 75% na viabilidade espermática e no percentual de células reativas ao teste hiposmótico, apesar de 60% das células permanecerem móveis. No entanto, os procedimentos de congelação e descongelação causaram perda total da viabilidade e da motilidade, enquanto o percentual de células reativas ao teste hiposmótico foi de apenas 3%. Isso mostra a importância do uso de diluentes como provedor de suporte energético e proteção contra as baixas temperaturas e a necessidade de utilização de um diluente capaz de prolongar a viabilidade espermática (Ghalsasi e Nimbkar, 1996). Ressalte-se que a manipulação de sêmen é capaz de ativar a produção de ROS, sendo esse fator agravado pela redução das concentrações de antioxidantes no plasma seminal como consequência do processo de diluição (Agarwal et al., 2006).

Apesar das taxas de prenhez aceitáveis após uso do sêmen ovino fresco para inseminação artificial (IA), a curta sobrevida destes espermatozoides, associada ao limitado número de doses de sêmen que pode ser obtido por carneiro num determinado período, restringe seriamente o uso de um determinado reprodutor (O'Hara et al., 2010), sendo necessária a realização de estudos que objetivem o prolongamento da capacidade fertilizante destes gametas. Por sua vez, a utilização do sêmen congelado apresenta como principal vantagem a possibilidade de existir um grande distanciamento espacial e temporal entre o momento da colheita e da IA. Entretanto, devido à baixa taxa de prenhez obtida quando se realiza a inseminação cervical com sêmen congelado, a deposição intrauterina ainda é a mais utilizada (Salamon e Maxwell, 1995).

Assim, a decisão sobre o tipo de técnica a ser utilizada para manutenção dos espermatozoides sob condições artificiais deve levar em consideração um grande conjunto de fatores, dentre eles os inerentes à técnica.

Refrigeração do sêmen ovino

O principal método de armazenamento do sêmen ovino em estado líquido consiste em submetê-lo a temperaturas reduzidas, determinando inibição reversível do metabolismo das células. Independente de diluente, taxa de diluição e temperatura de armazenamento, observa-se maior redução da qualidade espermática à medida que aumenta o tempo de incubação, sendo que as principais ocorrências observadas são a diminuição da motilidade e integridade morfológica, eventos provavelmente estimulados pelo acúmulo de produtos do metabolismo, principalmente ROS, que diminuem o transporte e a sobrevivência dos espermatozoides no trato genital feminino (Salamon e Maxwell, 2000; Aisen et al., 2005).

Em estudos utilizando microscopia confocal *in situ*, visando avaliar o efeito da refrigeração do sêmen ovino sobre o trânsito espermático no trato genital feminino após IA, observou-se que a refrigeração do sêmen antes da IA cervical reduziu sua capacidade de migração através da cérvice e a proporção de espermatozoides móveis com deslocamento linear em direção à junção úterotubárica, bem como seu trânsito no lúmen da tuba uterina (Druart et al., 2009).

Apesar de o mecanismo de transporte espermático através do trato genital feminino ainda não ter sido completamente elucidado, o fluido cervical é a primeira barreira que as células devem ultrapassar para atingir o local da fertilização (Robayo et al., 2008). Esses autores identificaram que, dentre os parâmetros cinéticos avaliados em sistemas computadorizados, as células espermáticas ovinas que apresentaram maior eficiência de migração pelo muco cervical autólogo mostraram valores superiores de velocidade curvilinear (VCL), velocidade média do trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), amplitude lateral da cabeça (ALH) e linearidade (LIN), tendo sido observada uma correlação positiva entre VCL e VAP e a migração através do muco cervical de ovelhas.

Para tentar melhorar os resultados obtidos com a refrigeração do sêmen, têm sido testados diluentes com diferentes composições. O'Hara et al. (2010) utilizaram os diluentes leite-gema e os comerciais Andromed (Minitub, Alemanha) e INRA 96 (IMV, França) para incubação do sêmen a 5˚C ou 15˚C, por até 72 horas. O armazenamento do sêmen resultou em efeito negativo significante tanto na viabilidade quanto na motilidade espermática, independente do diluente utilizado. Todavia, a viabilidade permaneceu praticamente estável a 5˚C no intervalo entre 24 e 74 horas após a colheita das amostras, enquanto a 15˚C observou-se declínio linear de acordo com o tempo. A capacidade de penetração no muco artificial diferiu entre os diluentes após seis e 24 horas pós-colheita, mas nenhuma diferença foi observada após 48 e 72 horas de incubação. Quando armazenado a 5˚C para execução de FIV nos diferentes períodos de incubação, a taxa de clivagem e o percentual de formação de blastocistos permaneceram inalterados. Um resultado oposto foi observado na fertilidade *in vivo* do sêmen armazenado a 5˚C, após inseminação cervical, devido à redução linear significativa de 60,2, 52,2, 30,4 e 18,3% para amostras armazenadas durante 0, 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

Paulenz et al. (2002) também obtiveram resultados semelhantes ao compararem as temperaturas de 5˚C e 20˚C para manutenção da viabilidade do sêmen ovino em diferentes diluentes contendo gema de ovo em sua constituição. Observou-se que a temperatura interagiu com o diluente apenas na motilidade espermática, não apresentando diferença quanto à integridade de membrana e de acrossoma, assim como no teste hiposmótico e na capacitação. Entretanto, todos os parâmetros apresentaram redução ao longo do período de incubação, independente da temperatura ou do diluente utilizado, havendo efeito deletério menor após incubação do sêmen a 5˚C, em relação à temperatura de 20˚C. Os resultados citados corroboram com os relatos de Menchaca et al. (2005), que, após IA cervical em tempo fixo com observação de estro, observaram que a utilização do sêmen ovino refrigerado durante 12 horas obteve resultado similar ao obtido com sêmen fresco; entretanto, após 24 horas de refrigeração, reduziu significativamente a taxa de prenhez.

A taxa de diluição do sêmen ovino mantido sob refrigeração também é capaz de interferir na qualidade espermática. Após manutenção do sêmen ovino a 4˚C durante oito dias, Kasimanickam et al. (2007) relataram que a concentração de 50 milhões de espermatozoides/ml resultou em maior índice de fragmentação de DNA após quatro dias de incubação, menor percentual de células com alto potencial de membrana mitocondrial desde o primeiro dia, com membrana intacta a partir do sexto dia de incubação e com motilidade progressiva desde o primeiro dia, quando comparada à concentração de 200 milhões de espermatozoides/ml. No entanto, a maior concentração espermática determinou pequena influência nos parâmetros da cinética, como VCL, ALH, STR e LIN, sem influenciar os parâmetros de VAP, VSL.

Criopreservação do sêmen ovino

Há muito tempo é conhecida a expressiva mortalidade dos espermatozoides de mamíferos durante o armazenamento, principalmente quando utilizada a criopreservação. O espermatozoide que sobreviveu à refrigeração, particularmente no intervalo em que ocorre a formação dos cristais de gelo e, consequentemente, a desidratação celular (Kumar et al., 2003), e se manteve potencialmente viável à temperatura de -196˚C ainda deve ser capaz de superar o estresse da descongelação, transpassando pela segunda vez a zona crítica de temperatura, entre -15 e -60˚C (Söderquist et al., 1997).

O choque térmico causado pelo processo de refrigeração antes da congelação, provavelmente, está relacionado à transição de fase dos lipídios da membrana celular, alterando sua função. Proteínas de membrana encontram-se inseridas muitas vezes em áreas específicas, separadas pela presença dos lipídios sob diferentes fases, e as modificações citadas anteriormente podem interferir diretamente com canais proteicos, como observado pelo aumento da permeabilidade da membrana após a refrigeração. Vale ressaltar que o ejaculado é formado por subpopulações de células com variável resistência a muitas fontes de estresse, entre elas o osmótico (Watson, 2000).

Além disso, a qualidade do sêmen armazenado é influenciada pelos procedimentos associados à manipulação, como diluição, centrifugação e diluente (Kankofer et al., 2005). Mais especificamente em ovinos, outros fatores também influenciam a sobrevivência das células espermáticas pós-descongelação, como os tipos e a concentração dos ingredientes utilizados nos diluentes de sêmen, a concentração de glicerol, além da qualidade do sêmen (El-Alamy e Foote, 2001), não tendo sido observada influência das palhetas utilizadas para o envase (0,25 ou 0,5 ml) ou dos diferentes procedimentos de descongelação das palhetas de 0,5 ml (35˚C por 20 segundos ou 70˚C por oito segundos) ou de 0,25 ml (35˚C por 15 segundos) após IA cervical (Nordstoga et al., 2009).

Devido às alterações físicas e osmóticas inerentes à criopreservação, as membranas plasmática e acrossomal, especialmente importantes para sobrevivência e fertilidade dos espermatozoides após o processo de congelação-descongelação, são consideradas os locais primários de alterações (Ollero et al., 1998), sendo esse fator agravado pela maior lipoperoxidação da membrana durante a criopreservação (Alvarez e Storey, 1992). Em virtude disso, existem relatos de maior percentual de células espermáticas com acrossoma reagido (Peris et al., 2004; Joshi et al., 2005), redução significativa na motilidade e no percentual de espermatozoides rápidos (Joshi

et al., 2005), além de interferência com o movimento flagelar (Aitikens e Bennetts, 2006), culminando com a sobrevivência após criopreservação de, aproximadamente, 50-60% da população de células espermáticas (Watson, 2000).

Essas modificações funcionais podem resultar em diferentes dinâmicas de interação entre os espermatozoides e os constituintes do trato genital feminino. Gillan et al. (2000) incubaram amostras de sêmen ovino, fresco e pós-descongelação, em monocamadas de células do oviduto, e observaram que os espermatozoides descongelados, após estarem em contato com as células do oviduto, ligavam-se imediatamente a elas, sendo liberados após duas horas, enquanto nas amostras de sêmen fresco uma pequena proporção de espermatozoides ligava-se imediatamente, alcançando a máxima ligação após duas horas, quando, então, estes eram gradativamente liberados.

Gillan et al. (1999) avaliaram a dinâmica de capacitação das células espermáticas provenientes de amostras de sêmen fresco ou descongelado, com auxílio da clortetraciclina (CTC), e sua perda no trato genital feminino. Estes autores observaram que a perda de espermatozoides descongelados ocorre de forma mais acentuada após 30 minutos da inseminação laparoscópica, apresentando ainda maior percentual de células com acrossoma reagido, perda da cauda e menor percentual de células móveis, quando comparadas ao sêmen fresco.

O processo de criopreservação também induz à desnaturação do DNA. Todavia, ressalta-se que esta desnaturação não é detectada imediatamente após a descongelação, mas pode ser observada após incubação, evidenciando a existência de maior degradabilidade do DNA em consequência da maior susceptibilidade da cromatina à desnaturação após a congelação-descongelação. Todavia, os parâmetros cinéticos das amostras descongeladas (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR e LIN) não apresentaram diferença em relação ao sêmen fresco, mostrando que o processo de desnaturação do DNA não necessariamente apresenta relação com outros parâmetros espermáticos comumente estudados (Peris et al., 2004).

A dinâmica de fragmentação do DNA também é influenciada pelo indivíduo, tendo sido relatado por López-Fernández et al. (2008) um diferente grau de sensibilidade do DNA de espermatozoides dos carneiros ao longo do tempo de incubação, por meio do estabelecimento do índice de fragmentação do DNA. Ao mesmo tempo, estes autores observaram que a velocidade de degradação do DNA de espermatozoides ovinos descongelados é aproximadamente cinco vezes maior do que daqueles submetidos apenas à refrigeração.

Diversos diluentes também vêm sendo testados para a criopreservação. Windsor e White (1995) mostraram que a osmolaridade do meio pode interferir diretamente no metabolismo espermático, visto que, quando estes gametas foram expostos a meios hipotônicos (150 mOsml l^{-1}) ou hipertônicos (450 mOsml l^{-1}), constatou-se redução da concentração de Rodamina 123, indicativa da taxa respiratória das mitocôndrias da célula. Células espermáticas criopreservadas em diluente hipertônico à base de trealose apresentaram uma menor incidência de alterações ultraestruturais nas membranas plasmática e acrossomal, bem como uma menor ocorrência de lipoperoxidação nas células espermáticas após três horas de incubação, quando comparadas à utilização de diluentes isotônicos, tendo sido sugerido pelos autores que essas diferenças foram geradas pela capacidade de interação da trealose com os fosfolipídios das membranas (Aisen et al., 2005).

Valente et al. (2010), na tentativa de substituir parcial ou totalmente a gema do ovo no diluente para sêmen ovino, em virtude da variação em sua constituição, observaram que a suplementação com trealose e glicina, associada à substituição da glicose pela frutose, mais facilmente metabolizada pelo espermatozoide, não foi capaz de compensar a insuficiência da gema de ovo, tendo sido observado melhor motilidade, termorresistência, fertilidade *in vitro* e *in vivo* pós-descongelação ao utilizarem gema de ovo no diluente. Vale ressaltar que, teoricamente, o grau de lesão observado no processo de congelação-descongelação é exibido durante a incubação espermática pós-descongelação, uma vez que quanto maior o dano latente menor a longevidade destes gametas no trato genital feminino (Bag et al., 2004).

Diferentes tempos de equilíbrio pré-congelação podem ser utilizados para a criopreservação do sêmen, sendo caracterizado pelo intervalo entre a adição do glicerol e a congelação das células espermáticas. Acredita-se que esse período permita o melhor equilíbrio osmótico após a interação da célula espermática com o crioprotetor (Emmens e Blackshaw, 1950), sendo também importante em condições de colheita e processamento de sêmen à campo, devido ao tempo necessário para a finalização dos procedimentos pré-criopreservação (Foote e Kaproth, 2002).

Purdy (2006) avaliou o efeito de diferentes tempos de equilíbrio pré-congelação sobre as características do sêmen ovino pós-descongelação e não constatou influência da refrigeração sobre motilidade, integridade da membrana plasmática, percentual de células com acrossoma intacto e capacidade de ligação à membrana perivitelínica, após manter o sêmen por até 48 horas a 5˚C antes da criopreservação.

Antioxidantes e sêmen

O sêmen apresenta um complexo sistema redox, em que o equilíbrio entre o potencial antioxidante do plasma seminal e dos espermatozoides e o potencial oxidativo dos metabólitos espermáticos, particularmente ativos em condições não fisiológicas, controlam a taxa de lipoperoxidação espermática (Stradaioli et al., 2007).

Dessa forma, a manipulação *in vitro* de gametas pode expor as células a estresse oxidativo adicional, postulando-se a necessidade de uma proteção exógena (Taylor, 2001), em virtude da necessidade de as células espermáticas apresentarem mecanismos capazes de combater, parcialmente ou totalmente, a produção de ROS por meio de sistemas antioxidantes enzimáticos ou complexos vitamínicos, com o objetivo de prevenir a peroxidação excessiva dos substratos (Silva, 2006).

Em condições fisiológicas, 1 a 3% dos elétrons envolvidos na cadeia de transporte de elétrons determinam a formação de espécies reativas ao oxigênio (Guerin et al., 2001). Todavia, o estímulo à formação de ROS induzido pela congelação também pode estar relacionado a alterações na respiração e no intervalo entre ciclos respiratórios/estado de repouso celular (Schober et al., 2007) ou à liberação de ROS pelas células espermáticas defeituosas ou mortas durante o processo de criopreservação (Bailey et al., 2000) ou mesmo com danos subletais (Watson, 2000). Dessa forma, o sistema antioxidante presente no plasma seminal é muito importante para a proteção espermática (Kasimanickam et al., 2006), fato esse evidenciado pela maior concentração de antioxidantes no plasma seminal que em outros líquidos biológicos (Taylor, 2001).

Em ovinos, foi observado ainda que as enzimas antioxidantes se distribuem por diversas regiões do espermatozoide, caracterizando a existência de subpopulações espermáticas de acordo com o padrão de distribuição delas, onde se observou que a SOD se encontra nas regiões acrossomal, pós-acrossomal e no flagelo, enquanto a GPx está localizada nas regiões pós-acrossomal e apical da cabeça, e a GR se distribui ao longo do flagelo. Todavia, o processo de congelação-descongelação induz a uma mudança considerável na distribuição destas enzimas nas células espermáticas (Marti et al., 2008).

Sabe-se ainda que os ovinos são considerados animais poliéstricos estacionais, o que interfere diretamente nos seus aspectos reprodutivos (Legan e Karsch, 1983). Assim, diversos parâmetros espermáticos podem sofrer alterações em consequência da estacionalidade reprodutiva, incluindo o potencial antioxidante do plasma seminal, como foi mostrado por Martí et al. (2007), por meio da maior atividade antioxidante da SOD, GPx, GR e catalase no plasma seminal fora do período de estação de monta, quando comparado com o período de estação de monta. Os autores afirmaram que essa maior proteção antioxidante seria importante para manutenção do potencial fertilizante dos espermatozoides, enquanto os parâmetros reprodutivos encontram-se sob condições subótimas.

Cordeiros classificados como satisfatórios, questionáveis ou insatisfatórios para a reprodução, a partir dos parâmetros de circunferência escrotal, motilidade, morfologia espermática e percentual de polimorfonucleares no ejaculado, apresentaram diferentes características antioxidantes seminais. Observou-se que os animais classificados como satisfatórios apresentaram peroxidação lipídica significativamente inferior, tanto no plasma seminal quanto nos espermatozoides, e menor atividade da GPx nas células espermáticas comparados aos demais grupos. A atividade da SOD foi inferior no plasma seminal dos animais insatisfatórios quando comparados aos questionáveis, os quais não diferiram dos satisfatórios. A atividade da GPx e a peroxidação lipídica do plasma seminal e espermatozoides foram negativamente correlacionadas com o percentual de células com motilidade progressiva e morfologicamente normais (Kasimanickam et al., 2006).

Adição de antioxidantes ao diluente

A utilização de antioxidantes como suplementos em meios básicos de diluição, visando melhorar a qualidade das células espermáticas após o processamento, vem sendo testada, gerando resultados contraditórios.

Enquanto a adição de glutationa (5 mM) e glutationa reduzida (5 mM) ao meio utilizado na criopreservação do sêmen ovino não foi capaz de melhorar o percentual de espermatozoides móveis, viáveis, reativos ao teste hiposmótico e com morfologia normal, a adição de cisteína (5 mM) melhorou a motilidade pós-descongelação. A concentração de malonaldeído, parâmetro indicador de lipoperoxidação, também não se alterou após adição de nenhum dos antioxidantes citados anteriormente, a despeito da elevação variável nas concentrações de GSH e GPx, após adição de glutationa e glutationa reduzida ao meio, ou mesmo da elevação na concentração de catalase, após a adição de cisteína (Bucak et al., 2008). Os autores relataram que a lipoperoxidação aparentemente não é o principal fator que influencia a qualidade espermática pós-descongelação.

Em contrapartida, a adição de glutamina (5 mM) ao diluente utilizado para congelação do sêmen ovino aumentou o percentual de espermatozoides móveis e com membranas íntegras avaliadas pelo teste hiposmótico, quando comparado a 2,5 mM ou sem adição de antioxidante. A glutamina na referida concentração também elevou a concentração de catalase, mas não da SOD, quando comparado aos demais tratamentos. Observou-se, ainda, que a produção de malonaldeído não foi influenciada pela adição da glutamina, reforçando informação anterior de que a lipoperoxidação não é preponderante para redução da qualidade espermática pós-descongelação (Bucak et al., 2009).

Maia et al. (2009) testaram a adição de catalase e Trolox, um antioxidante hidrossolúvel derivado da vitamina E, ao meio de criopreservação do sêmen ovino e observaram que a adição de Trolox reduziu a motilidade espermática em relação aos demais tratamentos, inclusive o sem adição de antioxidantes. No entanto,

a catalase aumentou o percentual de células espermáticas viáveis avaliadas com auxílio do iodeto de propídeo, em relação aos demais tratamentos. Todavia, a atividade mitocondrial pós-descongelação manteve-se equivalente em todos os grupos avaliados.

Por outro trabalho, a utilização da catalase (100 UI/mL) ao diluente de congelação do sêmen ovino, seguida da sexagem em citômetro de fluxo, não interferiu em nenhum dos parâmetros de espermáticos avaliados com auxílio de computador (*Computer Assisted Sperm Analysis* – CASA; de Graaf et al., 2007).

Em ovinos, comparando-se diluentes à base de leite/gema ou de sacarose, Martí et al. (2007) selecionaram espermatozoides pela técnica de *swim-up* e as células recuperadas foram novamente incubadas a 15˚C durante seis horas. Apesar de os valores de motilidade, viabilidade e resposta ao teste hiposmótico terem sido similares para os espermatozoides provenientes do diluente à base de leite/gema ou sacarose, imediatamente após a seleção espermática, o diluente à base de leite/gema preservou melhor estes parâmetros ao longo das seis horas de incubação. Por outro lado, imediatamente após a seleção espermática, as atividades da SOD, GR e GPx foram maiores ao utilizarem diluente à base de sacarose, enquanto os espermatozoides diluídos em meio à base de leite/gema foram mais eficazes em manter a atividade das enzimas ao longo das seis horas de incubação a 15˚C.

Upreti et al. (1997), trabalhando com sêmen ovino refrigerado (15˚C) por até dois dias, em meio quimicamente definido adicionado de antioxidantes, submeteram alíquotas incubadas (1, 24 e 48 horas) a reincubação (38˚C) por até 30 horas. Os autores relataram que a adição de vitamina E inibiu a motilidade espermática, enquanto a adição de catalase não interferiu na motilidade.

Bucak e Tekin (2007) estudaram o efeito da adição de glutationa, taurina e trealose ao diluente sobre as características do sêmen ovino submetido à refrigeração (5˚C) por até 30 horas. Após esse período, os melhores resultados para manutenção da motilidade, viabilidade e resposta espermática ao teste hiposmótico foram obtidos com a adição de trealose, na concentração de 50 mM, mas a elevação da sua concentração para 100 mM exerceu efeito deletério sobre a motilidade destes gametas. Os autores atribuíram essa alteração ao aumento da osmolaridade do meio, induzindo perda da estabilidade funcional da célula.

A adição de vitamina E, lactoalbumina e albumina sérica ao diluente Fiser (F1: 3,25% Tris; 9,3% frutose; 1,7% ácido cítrico; 25% gema de ovo e 2% glicerol; F2: 0,68% citrato de sódio; 0,15% TES; 0,36% glicina; 10,18% lactose; 1,18% rafinose; 0,5% frutose; 3,85% dextran e 12% glicerol) melhorar a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides pós-descongelação (Ollero et al., 1998), enquanto o uso de albumina sérica bovina (BSA), prolina, glicina-betaína e fosfatidilcolina não melhorou a qualidade do sêmen ovino pós-descongelação, sendo observada discreta melhoria com a adição de colesterol (Ollero et al., 1996).

Considerações finais

É possível observar que as células espermáticas ovinas submetidas a procedimentos de refrigeração e criopreservação, considerando-se sua maior sensibilidade ao processamento, apresentam alterações funcionais que têm impedido a obtenção de índices de fertilidade satisfatórios após inseminação cervical, dificultando a plena difusão da IA nesta espécie.

Igualmente, observa-se que a identificação de antioxidantes que sejam capazes de minimizar os danos à células espermáticas durante a refrigeração e congelação é um procedimento complexo, devido à variação nas características antioxidantes do ejaculado entre as diferentes épocas do ano, entre reprodutores ou mesmo entre diferentes ejaculados de um mesmo carneiro.

Referências bibliográficas

Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril*, v.86, p.503-512, 2006.

Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with threalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, v.50, p.239-249, 2005.

Aitken RJ. The human spermatozoa: a cell in crisis? *J Reprod Fertil*, v.115, p.1-7, 1999.

Aitikens RJ, Bennets L. Reactive oxygen species: friend or foe. In: De Jonge CJ, Barrat CLR. *The sperm cell:* production, maturation, fertilization, regeneration. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2006. p.170-192.

Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increase lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sub lethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl*, v.13, p.232-241, 1992.

Bag S, Joshi A, Naqvi SMK, Mittal JP. Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrossomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. *Theriogenology*, v.62, p.415-424, 2004.

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen preservation in domestic animals: a damaging and capacitating

phenomenon. *J Androl*, v.21, p.1-7, 2000.
Baker MA, Aitken RJ. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol*, v.216, p.47-54, 2004.
Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Rum Res*, v.75, p.128-134, 2008.
Bucak MN, Tekin N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Rum Res*, v.73, p.103-108, 2007.
Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Ulutaş PA. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on pot-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Rumin Res*, v.81, p.13-17, 2009.
Cummins JM, Jequier AM, Kan R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress. *Mol Reprod Dev*, v.37, p.345-362, 1994.
De Graaf SP, Evans G, Gillan L, Guerra MMP, Maxwell WMC, O´Brien JK. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the *in vitro* quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.67, p.217-227, 2007.
Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. *Mol Cell Endocrinol*, v.250, p.70-79, 2006.
Druart X, Cognié J, Baril G, Clément F, Dacheux JL, Gatti JL. *In vivo* imaging of *in situ* motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract. *Reproduction*, v.138, p.45-53, 2009.
El-Alamy MA, Foote RH. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Anim Reprod Sci*, v.65, p.245-254, 2001.
Emmens CW, Blackshaw AW. The low temperature storage of ram, bull and rabbit spermatozoa. *Aust Vet J*, v.26, p.226-228, 1950.
Foote RH, Kaproth MT. Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility. *J Dairy Sci*, v.85, p.453-456, 2002.
Ghalsasi PM, Nimbkar C. Evaluation of laparoscopic intrauterine insemination in ewes. *Small Rumin Res*, v.23, p.69-73, 1996.
Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. The interaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa with oviductal epithelial cells *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, v.12, p.237-244, 2000.
Gillan L, Skovgold K, Watson PF, Evans G, Maxwell WMC. Fate and functional integrity of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa following intrauterine insemination. *Reprod Fertil Dev*, v.11, p.309-315, 1999.
Guerin PF, Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, v.7, p.175-189, 2001.
Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.3-22, 2000.
Joshi A, Bag S, Naqvi SMK, Sharma RC, Mittal JP. Effect of post-thawing incubation on sperm motility and acrossomal integrity of cryopreserved Garole ram semen. *Small Rum Res*, v.56, p.231-238, 2005.
Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5˚C. *Theriogenology*, v.63, p.1354-1365, 2005.
Kasimanickam R, Kasimanickam V, Thatcher CD, Nebel RL, Cassel BG. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology*, v.67, p.1004-1012, 2007.
Kasimanickam R, Pelzer KD, Kasimanickam V, Swecker WS, Thatcher CD. Association of classical seminal parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology*, v.65, p.1407-1421, 2006.
Kumar S, Millar JD, Watson PF. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooled machines. *Cryobiology*, v.46, p.246-253, 2003.
Legan SJ, Karsch FJ. Importance of retinol photoreceptors to the photoperiodic control of seasonal breeding in ewe. *Biol Reprod*, v.29, p.316-325, 1983.
Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Picardo M, Maresca V, Panfili E, Tramer F, Boitani C, Dondero F. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. *Contraception*, v.65, p.301-304, 2002.
López-Fernandéz C, Fernandéz JL, Gosálbez A, Arroyo F, Vázquez JM, Holt WV, Gosálvez J. Dynamics of sperm fragmentation in domestic animals III. Ram. *Theriogenology*, v.70, p.898-908, 2008.
Maia MS, Bicudo SD, Azevedo HC, Sicherle CC, Sousa DB, Rodello L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Rumin Res*, v.85, p.85-90, 2009.
Martí E, Mara L, Martí JI, Muiño-Blanco T, Cebrián-Peréz JA. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology*, v.67, p.1446-1454, 2007.
Marti E, Martí JI, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Effect of the cryopreservation process on the activity

and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J Androl*, v.29, p.459-467, 2008.

Menchaca A, Pinczak A, Queirolo D. Storage of ram semen at 5ºC: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Anim Reprod*, v.2, p.195-198, 2005.

Nordstoga AB, Söderquist L, Adnoy T, Paulenz H. Effect of different packages and freezing/thawing protocols on fertility of ram semen. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.527-531, 2009.

O'Hara L, Hanrahan JP, Richardson L, Donovan A, Fair S, Evans ACO, Lonergan, P. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, v.73, p.541-549, 2010.

Ollero M, Muiño-Blanco T, López-Pérez MJ, Cébrian-Pérez JA. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in aqueous two-phase system: effect of different cryoprotectants. *J Chromatogr B*, v.680, p.157-164, 1996.

Ollero M, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T, Cébrian-Pérez JA. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology*, v.37, p.1-12, 1998.

Paulenz H, Söderquist L, Pérez-Pé R, Berg KA. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*, v.57, p.823-836, 2002.

Peris SI, Morrier A, Dufour M, Bailey JL. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl*, v.25, p.224-233, 2004.

Purdy PH. the pot-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 hours at 6 prior to cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, v.93, p.114-123, 2006.

Robayo I, Montenegro V, Valdés C, Cox JF. CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.393-399, 2008.

Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci*, v.38, p.1-36, 1995.

Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.77-111, 2000.

Schober D, Aurich C, Nohl H, Gille L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.68, p.745-754, 2007.

Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci*, v.1, p.78-86, 1996.

Silva PFN. *Physiology of peroxidation process in mammalian sperm*. 2006. 177f. Doctoral Thesis - Utrecht University, Faculty of Veterinary Science, Utrecht, 2006.

Söderquist L, Madrid-Bury N, Rodriguez-Martinez H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*, v.48, p.115-1125, 1997.

Stradaioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*, v.67, p.1249-1255, 2007.

Taylor CT. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environ Toxicol Pharmacol*, v.10, p.189-198, 2001.

Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Smith JF. Motility of ram spermatozoa during storage in chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci*, v.48, p.269-278, 1997.

Valente SS, Pereira RM, Baptista MC, Marques CC, Vasques MI, Silva Pereira MVC, Horta AEM, Barbas JP. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Anim Reprod Sci*, v.117, p.74-77, 2010.

Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas Jr AJ, Falcone T, Agarwal A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril*, v.80, supl. 2, p.844-850, 2003.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.481-492, 2000.

Windsor DP, White IG. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Anim Reprod Sci*, v.40, p.43-58, 1995.