



**Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia**

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Sâmia Rubielle Silva de Castro

**USO DE ANTIOXIDANTES PARA ELEVAÇÃO DA
QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO
DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)**

**Belém
2010**

Sâmia Rubielle Silva de Castro

**USO DE ANTIOXIDANTES PARA ELEVAÇÃO DA
QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO
DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal. Programa de Pós-graduação em Ciência
Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural
da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Rossetto Garcia

**Belém
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) -
Biblioteca Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural / UFPA, Belém, PA**

Castro, Silva Rubielle Sâmia

Uso de antioxidantes para elevação do sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*) / Sâmia Rubielle Silva de Castro; Orientador, Alexandre Rosseto Garcia – 2010.
71 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, PA, 2010.

1. Bubalino. 2. Sêmen. 3. Criopreservação. 4. Vitamina C. 5. Pentoxifilina.
6. Fertilidade. 7. Reprodução Animal. I. Título.

CDD - 21.ed. 636.0824

Sâmia Rubielle Silva de Castro

**USO DE ANTIOXIDANTES PARA ELEVAÇÃO DA
QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO
DE BÚFALOS (*Bubalus bubalis*)**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal. Programa de Pós-graduação em Ciência
Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária - Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural
da Amazônia.
Área de concentração: Produção Animal.

Data da aprovação. Belém - PA: 22 de abril de 2010.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Alexandre Rossetto Garcia
Embrapa Amazônia Oriental

Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro
Universidade Federal Rural da Amazônia

Prof. Dr. Luiz Fernando de Souza Rodrigues
Universidade Federal Rural da Amazônia

A minha mãe Solenilda Silva de Castro e meus avós José Augusto e Solange Silva por toda dedicação, muito amor, força e apoio em todos os sentidos.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por me abençoar grandemente e guiar meus passos em todos os momentos.

A minha mãe Solenilda e avós Solange e José Augusto pelo incentivo, apoio e por fazerem de mim uma pessoa melhor, ao me repassarem os mais sábios ensinamentos.

Ao Luís Armando Alvarenga, meu noivo, pelo seu amor por mim, amizade, dedicação incondicional, paciência nas longas horas de estudos e apoio neste projeto.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Rossetto Garcia, por sua constante orientação, enorme dedicação a esse projeto, com muita paciência e ensinamentos imprescindíveis para minha vida profissional.

Aos professores Dr. Willian Gomes Vale, Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro, Dr. Otávio Mitio Ohashi, Dr. Aluísio Silva e Dr. José Sousa por valiosas contribuições na pesquisa e sugestões importantes que contribuíram para execução e conclusão do trabalho.

Aos estagiários Geanne, Alessandra, Daniel e Arnaldo pela grande contribuição, apoio e momentos de descontração durante a coleta de dados.

Aos amigos Priscila Kahwage, Raimundo Júnior, Natália Barbosa, Talmir Quinzeiro Neto e Benjamin Nahúm pela ajuda, apoio e incentivo durante toda a minha jornada.

Aos funcionários da unidade de pesquisa animal Senador Álvaro Adolpho: Osvaldo, Januário, Deoclécio e Ivanildo pela ajuda e muitos momentos alegres, em especial ao Joarez e Valdemir, pelo constante auxílio e disposição para a realização deste trabalho.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Amazônia Oriental, pela colaboração e apoio ao ceder animais, funcionários, instalações e equipamentos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho, bem como a viabilização dos projetos “Rede de biotecnologia animal para seleção, multiplicação, segurança biológica, intercâmbio e disseminação de germoplasma visando a competitividade da pecuária nacional” e

“Desenvolvimento de métodos para elevação da qualidade e fertilidade de gametas usados em técnicas de reprodução animal assistida”(código 01.07.01.02.04).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), pelo suporte financeiro ao projeto “Uso de substâncias antioxidantes no sêmen congelado de bubalinos para aumento da qualidade e fertilidade a campo” (Processo 310680/2009).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro com bolsa de estudo, nível mestrado.

À Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia e à Embrapa Amazônia Oriental, que através do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, puderam proporcionar minha formação e crescimento profissional.

A todos que de alguma maneira ajudaram direta ou indiretamente na realização desta pesquisa.

Muito obrigada!

“No começo do Gênesis está escrito que **Deus criou o homem para reinar sobre os pássaros, os peixes, os animais domésticos e selvagens. Levou ao homem todos os animais, para que ele tivesse o privilégio de dar nome a eles.** Deus na sua grande sabedoria planejara a íntima relação entre os animais e o homem. Essa atitude foi para o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, porque assim, o fazendo, ninguém precisaria ensiná-lo a amar seu semelhante. Os animais têm sido utilizados pelo homem nas mais diferentes fases da civilização, como companhia, alimento, trabalho, transporte, lazer e, ainda, criados com caráter econômico na produção de carne, leite, ovos e mel, e até como produtos terapêuticos para o próprio homem. Em uma pequena troca, representando a eterna gratidão com os animais, a arte de curá-los, assim como a manutenção do seu bem estar gerou uma das mais belas ciências: a Medicina Veterinária. Grandes civilizações, como os egípcios e os gregos, tinham como símbolos mitológicos híbridos entre animais e formas humanas, dando-lhes o conceito de sagrado. Sábios eram! Na evolução da domesticação dos animais e na tentativa de produção e reprodução, as questões de bem estar animal não são desconsideradas por este homem que ama os animais. Cabe-nos o discernimento entre as atitudes corretas e erradas com os animais, e termos para com eles a verdadeira compaixão, pois ela está intimamente ligada à bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem.”

Sâmia Rubielle Silva de Castro

RESUMO

O sêmen bubalino sofre com o processo de congelamento que leva ao estresse oxidativo. O objetivo do trabalho foi desenvolver mecanismo de criopreservação de sêmen, com adição de substâncias antioxidantes, que permita reduzir a mortalidade espermática e as injúrias celulares, a fim de aumentar a potencial fertilidade do sêmen bubalino pós-descongelamento. Foram utilizados 5 touros bubalinos da raça Murrah (4-8 anos). As coletas de sêmen foram realizadas pelo método de “vagina artificial. Os ejaculados foram alíquotados para congelamento, configurando quatro tratamentos distintos: Grupo Controle - congelamento com diluidor TES-TRIS; Grupo Vitamina C - TES-TRIS associado à vitamina C (2,5 mM); Grupo Pentoxifilina - TES-TRIS com pentoxifilina (3,5 mM); e Grupo Vitamina C + Pentoxifilina - TES-TRIS com vitamina C (2,5 mM) e pentoxifilina (3,5 mM). Foram analisadas no sêmen *in natura* (Fase Pré-Congelamento) o volume, pH, cor, aspecto, turbilhonamento, concentração do ejaculado, motilidade progressiva, vigor, integridade de membrana plasmática e morfologia espermática. Após os processos de congelamento-descongelamento (Fase Pós-Descongelamento) e após o teste de termo-resistência (Fase Pós-TTR), as análises de motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática e morfologia espermática foram realizadas. Os resultados foram analisados por ANOVA, Teste de Tukey e as correlações foram calculadas pelo teste de Pearson, com uso dos programas BioEstat 5.0 e SPSS 12. O nível de significância adotado foi de 5%. Houve diferença estatística significativa entre tratamentos para motilidade progressiva na Fase Pós-TTR (Controle: $15,1 \pm 15,3\%$; Vitamina C: $25,6 \pm 16,3\%$; Pentoxifilina: $23,3 \pm 14,6$ e Vitamina C + Pentoxifilina: $28,6 \pm 16,2\%$; $P < 0,05$). Para as demais características espermáticas, não houve diferença estatística significativa entre tratamentos ($P > 0,05$). Dessa forma, o uso do antioxidante vitamina C, isolado ou associado à pentoxifilina, no sêmen bubalino, pode aumentar sua potencial fertilidade e maximizar a disseminação de material genético superior.

Palavras-chave: bubalino, sêmen, criopreservação, vitamina C, pentoxifilina, fertilidade, reprodução animal.

ABSTRACT

The buffalo semen suffers with the freezing process, which leads to oxidative stress. The aim of the research was to develop mechanism of semen cryopreservation, based on the addition of antioxidants substances, in order to decrease sperm mortality and cellular damages, to shift buffalo semen quality after thawing and to disseminate superior genetic material. Five Murrah buffalo bulls were used (4-8 years) and semen collections were performed with artificial vagina method. Before freezing, ejaculates were divided into four treatments: Control Group – frozen semen with TES-TRIS; Ascorbic Acid Group – TES-TRIS added with ascorbic acid (2.5 mM); Pentoxifylline Group - TES-TRIS with pentoxifylline (3.5 mM); and Ascorbic Acid + Pentoxifylline Group - TES-TRIS with ascorbic acid (2.5 mM) and pentoxifylline (3.5 mM). Raw semen (Pre-Freezing Phase) was analyzed to volume, pH, color, aspect, mass activity, spermatic concentration, spermatic motility, vigor, plasma membrane integrity and spermatic morphology. After thawing (Post-Thawing Phase) and after the thermoresistance test (Post-TTR Phase), analyses of spermatic motility, vigor, plasma membrane integrity and spermatic morphology were realized. Results were analyzed by ANOVA, Tukey Test and correlations were calculated by Pearson Test, using for that BioEstat 5.0 and SPSS 12 statistical softwares. The level of significance adopted was 5%. Significant statistical difference were observed in relation to progressive spermatic motility in Post-TTR Phase (Control: $15.1 \pm 15.3\%$; Ascorbic Acid: $25.6 \pm 16.3\%$; Pentoxifylline: 23.3 ± 14.6 and Ascorbic Acid + Pentoxifylline: $28.6 \pm 16.2\%$; $P < 0.05$). The other spermatic characteristics showed no significant statistical difference between treatments ($P > 0.05$). Thus, the use of ascorbic acid, isolate or associated to pentoxifylline, in the buffalo semen may increase the potential fertility and the dissemination of superior genetic material.

Key words: buffalo, semen, cryopreservation, ascorbic acid, pentoxifylline, fertility, animal reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Foto 1	Touro bubalino (<i>Bubalus bubalis</i>) doador de sêmen, pertencente ao rebanho da Embrapa Amazônia Oriental (Fonte: GARCIA, 2009)..... 34
Foto 2	Imagem de microscopia óptica durante avaliação de sêmen bubalino, em aumento de 100x (Fonte: Arquivo pessoal, 2009)..... 37
Foto 3	Imagem de microscopia de contraste de fase de espermatozóides bubalinos, em aumento de 1000x. No detalhe, espermatozóide normal (N) e espermatozóide com gota protoplasmática proximal (GPP) (Fonte: Arquivo pessoal, 2009)..... 38
Gráfico 1	Motilidade progressiva (%) de sêmen bubalino, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 42
Gráfico 2	Vigor do sêmen bubalino, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 46
Gráfico 3	Integridade de membrana plasmática (%) de espermatozóides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e após o teste de termorresistência (TTR), avaliada pela técnica de eosina-nigrosina (EN). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 47
Gráfico 4	Integridade de membrana plasmática (%) de espermatozóides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e após o teste de termorresistência (TTR), avaliada pelo teste hiposmótico (HOS). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 49
Gráfico 5	Frequência de defeitos menores (%) em espermatozóides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 51
Gráfico 6	Frequência de defeitos maiores (%) em espermatozóides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 52

- Gráfico 7 Frequência de defeitos de acrossoma (%) em espermatozóides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelação e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 53
- Gráfico 8 Frequência de defeitos de peça intermediária (%) em espermatozóides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelação e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 54
- Gráfico 9 Frequência de defeitos totais (%) em espermatozóides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelação e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 55

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Características físicas e morfológicas iniciais de ejaculados bubalinos, na Fase Pré-Congelação (n=30). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 41
Tabela 2	Motilidade progressiva (%) de sêmen bubalino, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelação e incubação. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 44
Tabela 3	Correlações estatísticas entre características espermáticas de sêmen bubalino, com ou sem adição de antioxidantes, em todas as fases do processo de congelação e incubação (n=360). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 56
Tabela 4	Correlações de Pearson observadas entre características espermáticas de sêmen bubalino, em decorrência dos tratamentos, com ou sem adição de antioxidantes, em todas as fases do processo de congelação e incubação (n=360). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010..... 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANOVA** - análise de variância
- AMPc** - adenosina monofosfato cíclico
- ATP** - adenosina trifosfato
- ATPases** - enzimas catalizadoras de ATP em ADP
- CBRA** - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
- CEPAE** - Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação
- DNA** - ácido desoxirribonucléico
- EN** - eosina-nigrosina
- FAO** - Food and Agriculture Organization
- g** - grama, unidade de medida de massa
- GMPc** - guanosina monofosfato cíclica
- GLUT5** - transportador da frutose
- °C** - grau Celsius, unidade de temperatura
- HO₂** - hidroperoxila
- H₂O₂** - peróxido de hidrogênio
- HOS** - teste hiposmótico
- IA** - inseminação artificial
- IATF** - inseminação artificial em tempo fixo
- IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- kg** - quilograma, unidade de medida de massa
- L** - litro, unidade de volume
- μL** - microlitro, unidade de medida de volume
- mg** - miligrama, unidade de medida de massa
- mL** - mililitro, unidade de medida de volume
- mM** - milimol, unidade de medida de concentração
- mOsm kg⁻¹** - miliosmoles por quilograma
- NADH** - nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADPH** - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
- NO[•]** - óxido nítrico
- O** - oxigênio
- O₂⁻** - ânion superóxido
- OH⁻** - hidroxila

OONO⁻ - peroxidonitrico

P - símbolo estatístico que denota grau de significância entre as variáveis estudadas

pH - potencial hidrogeniônico

PIB – produto interno bruto

% - porcentagem, unidade de razão na base 100

r - símbolo estatístico que representa o grau de correlação entre variáveis avaliadas

ROS – espécies reativas do oxigênio (*reactive oxygen species*)

Se - selênio

sptz - espermatozóide, gameta masculino

sptz/mL - espermatozoides por mililitro, unidade de concentração espermática

TES-TRIS - diluidor utilizado para congelação de sêmen, principalmente em bubalinos

TROLOX® - antioxidante sintético

TTR - teste de termorresistência

± - símbolo utilizado entre as unidades estatísticas de média e desvio padrão

< - símbolo matemático que indica valores inferiores

> - símbolo matemático que indica valores superiores

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BUBALINO.....	19
3.2 ULTRA-ESTRUTURA E METABOLISMO DOS ESPERMATOZÓIDES.....	22
3.3 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ROS) E EFEITOS DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ESPERMATOZÓIDES.....	25
3.4 UTILIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN	29
3.4.1 Vitamina C.....	31
3.4.2 Pentoxifilina.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 ANIMAIS, LOCAL E PERÍODO DO EXPERIMENTO.....	34
4.2 ASPECTOS ÉTICOS DO EXPERIMENTO.....	35
4.3 COLHEITA, CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN.....	35
4.4 FASES EXPERIMENTAIS.....	36
4.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DO SÊMEN.....	37
4.6 INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA.....	38
4.7 TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA (TTR).....	39
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SÊMEN NA FASE PRÉ- CONGELAÇÃO.....	41
5.2	MOTILIDADE ESPERMÁTICA.....	42
5.3	VIGOR.....	46
5.4	INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA.....	47
5.4.1	Avaliação com Técnica de Eosina-Nigrosina.....	47
5.4.2	Avaliação com Técnica do Teste Hiposmótico.....	48
5.5	MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	50
5.5.1	Defeitos Menores.....	50
5.5.2	Defeitos Maiores.....	51
5.5.3	Defeitos Totais.....	54
5.6	CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS.....	56
6.	CONCLUSÕES.....	59
7.	REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

A criação de bubalinos é uma atividade econômica emergente. Essa informação é corroborada pelo intenso crescimento nas taxas de produção de carne (12,4%) e leite de bubalinos (28,3%) registrado nos últimos 10 anos pela Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO, 2005). A espécie bubalina tem despertado interesse crescente nos pecuaristas na América Latina, por sua comprovada rusticidade e produtividade. O maior rebanho bubalino das Américas encontra-se no Brasil, e o Pará possui o maior contingente de búfalos do país, que corresponde a aproximadamente 42% do rebanho nacional. Segundo dados oficiais, o efetivo do rebanho bubalino no Pará é de 336.868 mil cabeças, cuja criação, abate, transformação e comercialização de produtos (carne, couro, leite e derivados) têm gerado contribuição substancial para o agronegócio do país e para o PIB do estado (IBGE, 2009).

Entretanto, para alcançar mercados exigentes, os produtores de bubalinos necessitam elevar o padrão genético de seus rebanhos, a fim de ofertar carne e leite de qualidade, a preços competitivos. Nesse contexto, o desenvolvimento e a utilização das biotécnicas da reprodução animal surgem como eixo central para aumentar de modo exponencial a capacidade de multiplicação de material genético superior e promover o melhoramento animal (OHASHI et al., 2003).

Dentre as biotécnicas da reprodução animal disponíveis, destaca-se a inseminação artificial (IA), que potencializa a difusão das características genéticas paternas e propicia grande amplitude de resultados nos programas de melhoramento animal (GARCIA et al., 2006). Isto é possível porque reprodutores altamente selecionados produzem espermatozoides suficientes para inseminar milhares de fêmeas por ano, diferentemente do que acontece na monta natural (NUNES, 2004). As principais vantagens da IA são o melhor aproveitamento da genética de reprodutores superiores, a obtenção de progênes mais produtivas e padronizadas, além da prevenção de doenças sexualmente transmissíveis no rebanho.

Em bubalinos, a IA é baseada no uso de sêmen congelado (BARNABE et al., 1994; RIBEIRO et al., 1994). A congelação de sêmen é um método de conservação que requer conhecimento da fisiologia das células espermáticas, bem como sobre os diferentes substratos, crioprotetores e antimicrobianos usados durante as diferentes fases do

processamento, a fim de se obter o maior número possível de células viáveis após a descongelamento (SILVA et al., 2002). Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, o congelamento celular ainda danifica as organelas e membranas do espermatozóide, induzindo, também, mudanças na capacitação espermática e na reação acrossomal (GARNER et al., 2001).

Os processos de refrigeração, congelação e descongelação produzem um estresse físico e químico na membrana dos espermatozóides, o que reduz sua viabilidade e capacidade fecundante. O choque pelo frio nos espermatozóides é associado com o estresse oxidativo induzido pela geração de espécies de oxigênio reativas, conhecidas com ROS. Estas representam um fator de risco, pois são altamente tóxicas aos espermatozóides. A peroxidação lipídica causada pelas ROS ocasiona danos estruturais ao acrossoma, à cabeça e à peça intermediária dos espermatozóides, bem como dá início ao processo de apoptose e induz a fragmentação do DNA. Existe uma correlação negativa significativa entre os níveis de ROS e a taxa de fertilização *in vitro* (AGARWAL et al., 2005) e supõe-se que o mesmo ocorra nos processo de fecundação *in vivo*.

Os antioxidantes são a principal defesa contra o estresse oxidativo induzido por radicais livres. Apesar da literatura científica moderna apresentar resultados de pesquisas com uso de antioxidantes no sêmen, o volume de informações que avaliem ou comparem os efeitos do emprego de antioxidantes no sêmen bubalino é, ainda, bastante limitado. Por isso, são relevantes os estudos sobre melhores protocolos de congelação, com adição de substâncias antioxidantes potencialmente capazes de elevar os parâmetros espermáticos e a qualidade seminal após a criopreservação em bubalinos.

Em virtude disso, a presente pesquisa foi baseada na hipótese de que a adição de substâncias químicas antioxidativas ao sêmen bubalino durante o processo de criopreservação é capaz de elevar os parâmetros de motilidade seminal, reduzir os níveis de danos estruturais e melhorar a qualidade do sêmen pós-descongelação e após o teste de termorresistência (TTR).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver mecanismo de criopreservação de sêmen bubalino que permita reduzir a mortalidade e as injúrias causadas pela congelação, a fim de aumentar a potencial fertilidade do sêmen bubalino pós-descongelação o que possibilita maximizar a disseminação de material genético superior.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar o efeito de dois diferentes antioxidantes, isoladamente ou em associação, sobre a motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática e morfologia dos espermatozóides bubalinos após o processo de criopreservação.

b) Determinar o efeito dos antioxidantes testados, isoladamente ou em associação, sobre a motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática e morfologia dos espermatozóides bubalinos após o teste de termorresistência.

c) Verificar as correlações existentes entre as características espermáticas investigadas, em função do uso isolado ou associado dos antioxidantes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BUBALINO

As pesquisas com sêmen bubalino criopreservado foram iniciadas na Índia, nos anos 50, por Bhattacharya e Srivastava (1955). Após sua publicação, outros trabalhos começaram a ser desenvolvidos em diferentes países. Contudo, havia ausência de um processamento tecnológico adequado para a espécie, que levasse em consideração diluidores, tempo de equilíbrio e métodos de congelação, uma vez que os trabalhos se baseavam naqueles produzidos com a espécie bovina. Após o Simpósio de Reprodução e Inseminação promovido pela FAO e o Governo da Suécia em Karnal, Índia, em 1979, avanços foram obtidos para conservação do sêmen bubalino (BARUSELLI e VALE, 2008).

No Brasil, os primeiros trabalhos sobre processamento tecnológico do sêmen e inseminação artificial em bubalinos foram realizados na Faculdade de Ciências Agrárias do Pará (FCAP), hoje Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), por Vale e colaboradores, no final da década de 70 e início da década de 80. Como consequência destes trabalhos, esta equipe realizou em 1982, no arquipélago do Marajó, as primeiras inseminações em búfalas no Brasil, que resultaram no nascimento de quatro bezerros (RIBEIRO et al., 1994). Na região Sudeste do Brasil, desde os anos 80 os grupos de pesquisa de Oba e de Barnabe vêm desenvolvendo trabalhos com crioprotetores e diluidores para a criopreservação de sêmen em bubalinos, respectivamente, na Universidade Estadual Paulista-Botucatu, e na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (OBA et al., 1993; BARNABE et al., 1994). Internacionalmente, estudos realizados na Itália por Zicarelli (1994) ganharam destaque mundial.

A criopreservação tem como objetivo a preservação das células espermáticas por longo tempo. Contudo, são necessárias técnicas que assegurem proteção e viabilidade espermática, sendo este o principal entrave da congelação do sêmen, com impacto sobre a indústria de inseminação artificial (AHMAD et al., 1980; OHASHI, 2002). O processo de criopreservação danifica as organelas e membranas do espermatozóide, induzindo, também, mudanças na morfologia, capacitação espermática e reação acrossomal (WATSON, 1995;

GARNER et al., 2001). Conseqüentemente, os protocolos de criopreservação visam minimizar esses efeitos deletérios aos espermatozóides (KUMAR et al., 2003).

Entre 32,5% e 58,8% dos espermatozóides bubalinos tornam-se inviáveis para a fecundação após o processo de congelação e descongelação (OBA et al., 1993). Esta fragilidade também foi demonstrada por Silva et al. (2002), os quais verificaram que 42,5% dos espermatozóides bubalinos tornam-se inviáveis para a fecundação após o processo de congelação. Além da alta mortalidade de células induzidas pela criopreservação, outro ponto que merece estudo é a capacidade fecundante do sêmen bubalino congelado, assunto ainda controverso. Chohan et al. (1992) descreveram que, mesmo com os avanços da IA com sêmen congelado de búfalo, as taxas de concepção para o sêmen pós-descongelação são de, aproximadamente, 33%. Já Dhami et al. (1996) relataram maiores taxas de concepção, alcançando 68,1% após uma única inseminação com uso de sêmen congelado-descongelado, com motilidade progressiva de 30% após incubação por 1 hora a 37 °C.

Comparativamente, ao criopreservar sêmen bovino, Borges (2008) obteve valores médios de motilidade progressiva de 76,8% e 51,9%, vigor de 4,4 e 3,0, integridade de membrana plasmática de 64,8% e 48,5%, nas fases pré-congelação e pós-descongelação, respectivamente. Após o teste de termorresistência (37 °C por 3 horas), obteve 34,5% de motilidade progressiva e 2,7 de vigor, com taxa de prenhez a campo de 58,7%. Arruda et al. (1992) observaram na espécie bovina taxa de prenhez de 60,3%, após uso de sêmen com 20% ou menos de motilidade após o teste de termorresistência (38 °C por 5 horas).

O desenvolvimento de técnicas adequadas para preservação de sêmen é um dos pontos essenciais para o avanço da reprodução animal nas diferentes espécies e vem sendo conseguido através da aplicação de biotécnicas cada vez mais modernas (PAPA et al., 2000). Como o uso das biotécnicas da reprodução para os bubalinos, invariavelmente, segue a metodologia desenvolvida para bovinos (OHASHI et al., 2003), por isso, há que se determinar metodologias espécie-específicas, as quais devem considerar as particularidades anatômicas e fisiológicas dos búfalos (OBA et al., 1993). Há que se ressaltar que, quando sistemas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) são adotados, há necessidade do uso de sêmen congelado de qualidade, e maiores graus de danos espermáticos pós-descongelação podem afetar sobremaneira a fertilidade dos lotes, trazendo prejuízos econômicos significativos (ARRUDA et al., 2005).

Muitos fatores podem afetar a sobrevivência dos espermatozóides. Dentre esses, estão a composição dos meios diluentes e os crioprotetores utilizados para congelação do sêmen

(LIU et al., 1998; GUTHRIE et al. 2002). O meio diluente e o crioprotetor são utilizados para proteger as células espermáticas dos choques térmicos e osmóticos que ocorrem durante o processo de criopreservação, o qual pode causar danos irreversíveis aos espermatozóides, devido à formação de cristais de gelo intracelular, que afetam a estrutura físico-química da célula. São negativamente afetados pela criopreservação a membrana plasmática, o acrossoma, a motilidade progressiva e o metabolismo para produção de energia, o que reduz o tempo de sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo da fêmea (PICKETT et al., 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995; VALCÁRCEL et al., 1996).

A composição do diluidor utilizado na congelação de sêmen de búfalo constitui um dos principais fatores que influenciam os resultados pós-descongelação (DHAMI et al., 1996). A composição dos lipídeos, açúcares e aminoácidos dos diluidores exerce efeito estabilizador na membrana plasmática, necessário para manter a integridade e o funcionamento desta membrana após a descongelação (GOODRICH e BALDESCHWEILER, 1991). Neste sentido, vários diluidores têm sido testados para melhorar a baixa sobrevivência do espermatozóide de touros bubalinos, mas ainda não existe concordância entre os autores quanto ao melhor diluidor para o processo de criopreservação, uma vez que os métodos utilizados para bovinos não apresentam resultados satisfatórios quando aplicados para sêmen bubalino (KUMAR et al., 1994).

Em experimento realizado por Vale et al. (1984) com diluidores à base de gema-citrato ou leite desnatado, a motilidade pós-descongelação ficou próxima de 20%. Quando a lactose foi usada, a motilidade pós-descongelação ficou em torno de 30%, e os melhores resultados foram obtidos com diluidores à base de TRIS e TES, com motilidade pós-descongelação variando de 50-60% para ambos. No teste de termo-resistência (TTR), o melhor resultado foi obtido com diluidor à base de TES-TRIS, no qual a motilidade espermática após cinco horas, de início do TTR, a 40°C, ainda era ao redor de 20%. Assim, a recomendação de Vale et al. (1984) é que TES-TRIS deve ser o meio de eleição para a congelação de sêmen bubalino, devido à manutenção da motilidade durante o processo de criopreservação e à viabilidade do sêmen pós-descongelação.

Esses dados são corroborados pelos de Barnabe et al. (1994), que demonstraram performance superior após congelação-descongelação do sêmen bubalino com uso de diluente à base de TES-TRIS, em comparação com TRIS-gema. A motilidade progressiva média inicial do sêmen *in natura* foi de 75,0% e, após descongelação com diluidor à base de TES-TRIS, a motilidade progressiva foi de 52,5%. Após 3 horas de incubação a 37 °C, a

motilidade passou a ser de 40,0%, enquanto para o TRIS-gema, em iguais condições, permaneceu entre 20 e 30,0%. As taxas de concepção do sêmen congelado foram de 56,8% para amostras com TES-TRIS e 49,3% para as congeladas com TRIS-gema. Assim, Vale et al. (1984) e Barnabe et al. (1994) recomendam o uso do diluidor à base de TES-TRIS para criopreservação de sêmen bubalino. Posteriormente, Rasul et al. (2000) utilizaram diluidor TES-TRIS em sêmen bubalino e observaram, após a descongelação, valores de 59,0% de motilidade progressiva, 41,4% de integridade de membrana plasmática e 53,2% de integridade de acrossoma.

3.2 ULTRA-ESTRUTURA E METABOLISMO DOS ESPERMATOZÓIDES

O sêmen de cada espécie animal possui características e exigências metabólicas, que determinam as condições necessárias para a criopreservação das células. Para alguns autores, a menor resistência das células espermáticas bubalinas à preservação pelo frio é devida a fatores intrínsecos e a diferenças bioquímicas, quando comparado ao bovino (MISKA et al., 1994; VALE, 2002).

Os espermatozóides são, normalmente, as menores células do organismo e possuem duas regiões morfológica e funcionalmente diferentes entre si (cauda e cabeça), que são contidas por uma única membrana plasmática. São células dotadas de um forte flagelo que os impulsiona através de um meio aquoso. Não possuem organelas citoplasmáticas, tais como ribossomos, retículo endoplasmático ou complexo de Golgi, os quais são desnecessários para a tarefa de transferir seu DNA ao óvulo. Por outro lado, os espermatozóides contêm várias mitocôndrias estrategicamente localizadas para fornecer energia ao flagelo (ALBERTS, 1997).

A cabeça do espermatozóide contém um núcleo haplóide, onde se encontra compactado o DNA, de modo que seu volume seja mínimo para o transporte. Os cromossomos de muitos espermatozóides não possuem as histonas das células somáticas e são condensados com proteínas simples, chamada protaminas. Na cabeça do espermatozóide encontra-se uma vesícula secretora especializada, chamada de vesícula acrossomal ou acrossoma. Esta vesícula contém enzimas hidrolíticas que auxiliam na penetração do espermatozóide no invólucro externo do ovócito (ALBERTS, 1997).

Quando o espermatozóide entra em contato com o ovócito, ocorre a reação acrossomal, quando o conteúdo da vesícula é liberado por exocitose. Em alguns espermatozóides, esta reação também expõe ou libera proteínas específicas que ajudam na fixação do espermatozóide de maneira firme ao óvulo (ALBERTS, 1997). Koonjaenak et al. (2007) observaram que touros bubalinos mantidos em central de inseminação artificial apresentam baixa incidência (1,1%) de defeitos de acrossoma.

A cauda, ou flagelo, impulsiona o espermatozóide e auxilia na sua entrada pelo invólucro do ovócito. É dividida em peça intermediária, onde estão localizadas as mitocôndrias que envolvem o início do flagelo, e a peça principal (ALBERTS, 1997). A importância funcional das mitocôndrias na peça intermediária está relacionada com a participação das duas principais vias metabólicas, fosforilação oxidativa e glicólise, na produção de ATP nos espermatozóides (KAMP et al., 2003; CELEGHINI, 2005), necessário para manter as estruturas celulares, composição iônica intracelular, e mais do que isso, a motilidade (KAMP et al., 2003).

A cauda tem um axonema central, que se origina de um corpo basal situado próximo ao núcleo. O axonema consiste em dois microtúbulos centrais simples cercados por nove pares de microtúbulos dispostos simetricamente. O flagelo de algumas espécies, incluindo os de mamíferos, difere dos outros flagelos por possuir, além do modelo de axonema comum de 9+2, 9 fibras extras externas e densas, compostas principalmente de queratina. Essas fibras são rígidas e não contráteis, e seu papel na curvatura do flagelo não está claro, mas sabe-se que o movimento flagelar é causado pelo deslizamento dos pares de microtúbulos adjacentes. O movimento flagelar é alimentado por proteínas motoras chamadas dineínas, que usam a energia da hidrólise do ATP para o deslizamento dos microtúbulos (ALBERTS, 1997).

O espermatozóide pode utilizar tanto o metabolismo aeróbico, quanto o anaeróbico para adquirir níveis de energia necessários à motilidade. Em condições normais, o sêmen possui pelo menos quatro substâncias que podem ser utilizadas de modo direto ou indireto como fonte de energia: frutose, sorbitol e glicerilfosforilcolina, que estão presentes no sêmen, e o plasmalogênio, presente no espermatozóide (TURNER, 2003). Contudo, o principal nutriente dos espermatozóides é a frutose, sintetizada a partir da glicose nas vesículas seminais (JONES e CONNOR, 2000).

O processo de síntese de frutose envolve a redução dependente da NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) da glicose a sorbitol (redutase das aldoses) e a oxidação dependente do NAD⁺ do sorbitol a frutose (desidrogenase do sorbitol).

O sorbitol é o poliálcool que resulta da redução do grupo aldeído da glicose. O fato dos espermatozoides consumirem frutose e do líquido seminal conter este açúcar dá aos gametas masculinos uma vantagem competitiva sobre outras células que povoam a vagina, como fungos e bactérias, o que contribui para sua sobrevivência e herança dos genes contidos nos espermatozoides. A membrana citoplasmática dos espermatozoides contém GLUT5, o transportador da frutose (JONES e CONNOR, 2000). A maior disponibilidade de frutose para o espermatozoide, associada à sua capacidade de consumo, está diretamente relacionada com maiores índices de motilidade, integridade de membrana plasmática e fertilidade. O consumo da frutose permite que se prolongue o período de incubação, verificado experimentalmente em bovinos, humanos e coelhos (ABDEL-GHAFFAR et al., 1994).

Aproximadamente 90% da produção de energia celular ocorre nas mitocôndrias por meio do processo de fosforilação oxidativa. As duas importantes formas de geração de adenosina trifosfato mitocondrial são o ciclo de Krebs e a β -oxidação, que precedem a fosforilação oxidativa, o maior gerador de adenosina trifosfato, por meio da cadeia de transporte de elétrons (CÂMARA e GUERRA, 2008). O ATP é gerado pelas mitocôndrias localizadas na parte anterior da cauda do espermatozoide, onde o mesmo é necessário (ALBERTS, 1997). Porém, como toda a extensão do flagelo necessita de ATP, alguns autores sugerem que existam no espermatozoide métodos alternativos de produção de energia que são independentes da fosforilação oxidativa mitocondrial, uma vez que o número de mitocôndrias espermáticas na peça intermediária é insuficiente para que o ATP produzido por estas alcance os segmentos mais distais do flagelo (KAMP et al., 2003; TURNER, 2003).

Em vários mamíferos, muitas enzimas glicolíticas foram identificadas na bainha fibrosa e peça principal: hexoquinase, lactato desidrogenase, GAPD-S gliceraldeído e 3-fosfato desidrogenase. Os espermatozoides de mamíferos, em condições aeróbicas, produzem lactato a partir de glicose. Então, se considera que a glicólise na peça principal, mas não necessariamente a fosforilação oxidativa na peça intermediária devem ser os pontos críticos para uma função espermática normal (KAMP et al., 2003; TURNER, 2003). Ainda assim, a fosforilação oxidativa é mais eficiente do que a glicólise para a produção de ATP (CÂMARA e GUERRA, 2008).

3.3 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ROS) E EFEITOS DO ESTRESSE OXIDATIVO EM ESPERMATOZÓIDES

O espermatozóide é uma célula aeróbia. Assim, o oxigênio torna-se um elemento essencial para manutenção de suas funções. Entretanto, este elemento pode ocasionar sérios danos à célula espermática, caso esteja presente em elevadas concentrações, pela elevada formação de espécies reativas ao oxigênio, conhecidas como *reactive oxygen species* (ROS). O elemento oxigênio (O) é considerado um radical livre, já que apresenta desemparelhamento de elétrons na sua última camada, o que lhe confere alta reatividade (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). As ROS incluem todos os radicais derivados do oxigênio e encontrados em todos os sistemas biológicos. Entre as espécies reativas do oxigênio, as mais importantes são o radical ânion superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2), hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO^\cdot) (SHARMA e AGARWAL, 1996; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O radical ânion superóxido (O_2^-) é um radical livre formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente em ambiente aeróbico, rico em elétrons e próximo da 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. É um produto primário do sistema de formação das ROS, gera peróxido de hidrogênio após reação de desmutase (NORDBERG e ARNER, 2001).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas é importante devido a sua penetração em membranas biológicas. É extremamente danoso, pois tem vida longa. Uma vez produzido, o H_2O_2 é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes, como a catalase, a glutatona peroxidase e peroxiredutase. Age como intermediário na formação de ROS, como radical hidroxila, formado pela oxidação de metais de transição, principalmente o ferro. Armstrong et al. (1999) relataram que o peróxido de hidrogênio apresenta função deletéria em relação aos níveis intracelulares de ATP, resultando em diminuição da motilidade dos espermatozóides, além de causar muitos outros danos devido à alta capacidade de penetração em membranas biológicas. O H_2O_2 inibe a atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase, que controla o fluxo de glicose, que por sua vez controla a disponibilidade de NADPH (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1995).

O radical hidroxila (OH^\cdot) é considerado o mais reativo em sistemas biológicos, resultando em muitos danos aos sistemas biológicos. É formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{2+} ou Cu^{2+}), geralmente ligados em complexos protéicos como a ferritina, denominada de reação de Fenton (HALLIWELL, 1991). Esta reação ocorre através de reação de uma molécula de Fe^{2+} e uma molécula de H_2O_2 , com produção de OH^\cdot , ou uma molécula de OH^\cdot e uma molécula de Fe^{3+} , que pode ser reduzido em Fe^{2+} , sob ação de ânion superóxido e superóxido desmutase (NORDBERG e ARNER, 2001).

O óxido nítrico (NO^\cdot) é semelhante ao ânion superóxido, pois não reage diretamente com a maioria das moléculas biológicas, apesar de seu elétron desapareado. Contudo, reage facilmente com outros radicais livres, gerando radicais menos reativos. Se produzido em grande quantidade, juntamente com o ânion superóxido, reage produzindo o peroxinitrito (OONO^\cdot), que é um elemento citotóxico (NORDBERG e ARNER, 2001).

Todas as células aeróbicas possuem substratos e enzimas capazes de neutralizar o potencial efeito tóxico das ROS, porém as defesas antioxidantes do espermatozóide são muito susceptíveis ao estresse oxidativo (NAIR et al., 2006). Quando em condições anaeróbicas, as células espermáticas também têm a capacidade de gerar as ROS. A produção de ROS no sêmen ocorre principalmente por espermatozoides imóveis e os morfológica e funcionalmente anormais (RHEMREV et al., 2001; KARDIVEL et al., 2009), e, dentre estas, nas células que possuem gotas protoplasmáticas proximais e distais. Sendo assim, acredita-se que a presença deste citoplasma residual aumentaria a capacidade destas células imaturas de gerarem NADPH, que serviria como fonte de elétrons para a produção de ROS. A excessiva geração de NADPH está relacionada com os níveis de ROS, as quais são geradas espontaneamente pelos espermatozoides após sua liberação da cauda do epidídimo (GOMEZ et al., 1998; AITKEN e BAKER, 2002).

Existem dois sistemas de produção de ROS em nível espermático, um localizado na membrana plasmática, semelhante à NADPH oxidase (que é enzima geradora de H_2O_2), e outro na peça intermediária e integrado ao sistema respiratório mitocondrial espermático, oxido-redutase dependente de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) (GAVELLA e LIPOVAC, 1992; AITKEN e BAKER, 2002; MAKKER et al., 2009). Por isso, NADPH e NADH são fontes geradoras de ROS (AITKEN e BAKER, 2002).

Em geral, observa-se equilíbrio entre a produção de radicais livres e de seus inibidores. Em condições fisiológicas, ou seja, em concentrações reduzidas, as espécies

reativas ao oxigênio mediam funções espermáticas normais, como capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozóide com o ovócito. Entretanto, pode ocorrer estresse oxidativo das células, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, decorrente do desequilíbrio entre a produção de ROS e ação dos antioxidantes encontrados no sêmen (SALEH e AGARWAL, 2002). A produção elevada de espécies reativas ao oxigênio induz danos à membrana mitocondrial, levando a modificações patofisiológicas nos espermatozóides (CÂMARA e GUERRA, 2008; MAKKER et al., 2009).

O efeito prejudicial das 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 (MAKKER et al., 2009). Os efeitos desta reação incluem perda irreversível de motilidade, inibição da respiração espermática, lesões no DNA espermático e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fertilizante do espermatozóide. De fato, a motilidade espermática é o indicador mais sensível do estresse oxidativo, situação em que ocorre a depleção do ATP intracelular e insuficiente fosforilação da proteína do axonema (WHITE, 1993; AITKEN e BAKER, 2002; SIKKA, 2004). As ROS também produzem extensivos danos às proteínas, modificam o citoesqueleto e causam alterações de mecanismos celulares (SHARMA e AGARWAL, 1996). O citoesqueleto proporciona o suporte para as estruturas celulares móveis especializadas, como cílios e flagelos, promovendo sua ativação. As ROS atuam bloqueando sua função, prejudicando a locomoção do espermatozóide (AITKEN e BAKER, 2002).

Em mamíferos, a membrana plasmática dos espermatozóides é rica em ácidos graxos poliinsaturados, sendo considerada um fator importante para a viabilidade do ejaculado submetido aos processos de criopreservação (PARKS e LINCH, 1992). Entretanto, as células espermáticas são altamente susceptíveis aos danos causados pelas ROS, devido à alta quantidade desses ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu citoplasma. Assim, as membranas espermáticas tornam-se susceptíveis a danos peroxidativos induzidos por radicais livres, que determinam uma substancial perda de ácidos graxos poliinsaturados, resultando em conseqüente redução da fluidez, responsável pela fusão espermatozóide-ovócito, na atividade das enzimas reguladoras que se ligam ao cálcio (Ca^{2+}) e na motilidade espermática (JONES et al., 1979; SIKKA, 2004; MAKKER et al., 2009). Ao relacionar a excessiva produção de ROS com as patologias espermáticas mais freqüentemente observadas, destacam-se as seguintes

alterações: cabeças anormais, defeitos de acrossoma, de peça intermediária e de cauda, fragmentação do DNA e gotas citoplasmáticas residuais na peça intermediária (GOMEZ et al., 1998).

Alguns procedimentos laboratoriais podem interferir na concentração de oxidantes espermáticos, demonstrando que a produção de ROS pode ser aumentada em amostras de sêmen de animais domésticos submetidas à centrifugação (TWIGG et al., 1998) e congelação (WANG et al., 1997; WATSON, 2000; BALL et al., 2001). Durante o processo de criopreservação, observa-se redução irreversível na motilidade, na integridade morfológica e na capacidade fertilizante dos espermatozóides, resultantes do acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo celular ou pelo aumento da produção de ROS (GUERRA et al., 2004).

Os processos de refrigeração, congelação e descongelação causam danos à membrana plasmática e ao acrossoma (HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995; KARDIVEL et al., 2009), com redução do metabolismo espermático para produção de energia e da motilidade progressiva, prejudicando o tempo de sobrevivência e a capacidade fecundante dos espermatozóides no sistema reprodutor feminino (WATSON, 2000). Nair et al. (2006) observaram que espermatozóides bubalinos submetidos ao resfriamento (4 a 8 °C) apresentaram decréscimo de motilidade progressiva (66,1% versus 13,8%) e de integridade da membrana plasmática (69,6% versus 16,5%) devido à ação das ROS e seus derivados oxidativos. O processo de congelação seminal pode elevar em até cinco vezes a produção de ROS, como observado em eqüinos (BALL et al., 2001). Maior produção de ROS durante a criopreservação de espermatozóides também foi observada em bovinos (CHATTERJEE e GAGNON, 2001).

O processo de congelação-descongelação também causa peroxidação lipídica e danos à membrana plasmática, devido ao rápido aumento na utilização de oxigênio pelas células espermáticas, com maior produção de radicais livres e lesão ao DNA (BALL et al., 2001; BAUMBER et al., 2003). Ainda, a descongelação causa redução da fluidez da membrana, interferindo nas ATPases, reduzindo os níveis de ATP, cuja diminuição tem relação na redução de outro mecanismo de proteção antioxidante, o sistema glutatona peroxidase e glutatona redutase, metabolizantes do peróxido de hidrogênio e dependente do NADPH (CHATTERJEE e GAGNON, 2001; NORDBERG e ARNER, 2001). Consequentemente, a redução na motilidade dos espermatozóides é observada (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1995; RHEMREV et al., 2001; GUERRA et al., 2004; MAKKER et al., 2009). Kardivel et al. (2009) observaram que a motilidade espermática progressiva diminuiu de 85,3% no sêmen *in*

natura para 57,2% após a descongelação do sêmen de bubalinos, e sugeriram que esses resultados se devem à ação das ROS, como principal causa de injúrias às células, com decréscimo na motilidade, na integridade de membrana plasmática e na atividade mitocondrial.

3.4 UTILIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

Os antioxidantes são a principal defesa contra o estresse oxidativo induzido por radicais livres. Em tese, o efeito oxidativo gerado pelas ROS pode ser reduzido pela utilização de substâncias antioxidantes no plasma seminal ou adicionadas aos diluentes utilizados na criopreservação. Nos últimos anos, muitas pesquisas relatam os efeitos do estresse oxidativo sobre a célula espermática, especialmente no sêmen de humanos. Nesse contexto, alguns pesquisadores têm adicionado substâncias antioxidantes em amostras de sêmen bovino (FOOTE et al., 2002; KLINC et al., 2007), eqüino (SILVA et al., 2008), bubalino (SINGH et al., 1996; NAIR et al., 2006), ovino (MAIA, 2006; MARTI et al., 2008), caprino (SINHA et al., 1996), suíno (BREZEZINSKA-SLEVBODSINSKA et al., 1995) e humano (TAYLOR, 2001; HAMMADEH et al., 2008).

Os antioxidantes têm ação inibitória na formação de ROS e nas suas ações. Entretanto, as enzimas antioxidantes intrínsecas não conferem total proteção ao plasma seminal (ZINI et al., 2001). Ainda não há consenso quanto à dosagem e ao tipo de antioxidante ideal para a proteção de espermatozóides nas diferentes espécies, talvez pelo fato das pesquisas utilizarem metodologias variadas, formas diferentes de avaliação espermática e diferenças na criopreservação do sêmen quanto à espécie, à raça e aos ejaculados dos animais (SILVA et al., 2008). Substâncias como vitamina C, urato, tocoferol, pentoxifilina e vitamina E têm sido reportadas como efetivas quanto à função antioxidante, promovendo proteção às células espermáticas de diversas espécies (GUERRA et al., 2004; GADEA et al., 2007).

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 desmutase, a glutatona redutase, a glutatona peroxidase e a catalase. Esta última 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 peróxido de hidrogênio. Os antioxidantes não

enzimáticos incluem a glutatona reduzida, o urato, a vitamina C, a vitamina E, a taurina, a hipotaurina, os carotenóides e ubiquinonas (Coenzima Q), o ácido úrico e o ácido lipóico (NORDBERG e ARNÉR, 2001; ROY e ATREJA, 2008).

Experimentalmente, tem-se demonstrado que os espermatozóides produzem quantidades suficientes de ROS endógeno para induzir a capacitação espermática e a reação acrossomal, promovendo sua capacidade de fertilização (GUERRA et al., 2004). Quando ocorre acréscimo na produção de ROS, principalmente dos radicais ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a capacitação espermática pode ocorrer precocemente no espermatozóide bubalino, e a utilização de antioxidantes, como a superóxido desmutase e a catalase, podem inibir a produção desses radicais, diminuindo os níveis de capacitação espermática precoce (ROY e ATREJA, 2008).

Esses sistemas enzimáticos podem atuar como removedores do agente oxidante, antes que ele ocasione lesão celular (glutatona reduzida, superóxido desmutase, catalase, glutatona peroxidase e vitamina E) ou ainda como agentes reparadores da lesão já ocorrida (vitamina C, glutatona redutase e glutatona peroxidase). A maioria destes elementos antioxidantes encontra-se no meio intracelular, com exceção da vitamina E, que também é constituinte estrutural da membrana espermática (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A glutatona peroxidase é uma enzima antioxidante que contém selênio (Se) em sua composição e remove radicais peroxila de vários peróxidos, aumentando, assim, a motilidade espermática. Da mesma maneira, a glutatona redutase regenera a glutatona reduzida de sua forma oxidada, com funções já conhecidas no núcleo do espermatozóide (GRIVEAU e LE LANNOU, 1997). A adição de Vitamina E aos ejaculados tem demonstrado efeitos variados sobre a motilidade espermática, semelhante àquela observada na utilização de seus análogos (α -tocoferol e Trolox®) no sêmen fresco de homens (DONELLY et al., 1999) e de ovinos (UPRETI et al., 1997).

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 dissulfito e proteção contra estresse oxidativo. Durante o descongelamento ocorre um aumento na formação de ROS devido a um acréscimo na síntese de superóxido, relacionado à queda nos níveis de atividade da superóxido desmutase 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 glutathione adicionada ao sêmen descongelado poderia atuar elevando os níveis de glutathione intracelular que iria ser utilizada pela glutathione peroxidase para prevenir a agressão causada pela peroxidação lipídica (GADEA et al., 2004).

3.4.1. Vitamina C

A vitamina C é um antioxidante hidrossolúvel encontrado no líquido extracelular. É capaz de neutralizar a ação da hidroxila, do superóxido e dos radicais do peróxido de hidrogênio, impedindo a aglutinação espermática. A vitamina C é encontrada em quantidade reduzida no plasma seminal de homens inférteis (AGARWAL et al., 2005).

A vitamina C 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. A mistura de Cu-ascorbato ou Fe-ascorbato estimula os danos oxidativos, levando à formação de radicais livres que danificam o ácido desoxirribonucléico, lipídios e proteínas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Além disso, a vitamina C é uma das defesas efetivas contra a peroxidação lipídica no plasma seminal, atuando na prevenção de danos oxidativos ao DNA. Portanto, o dano oxidativo no DNA do espermatozóide resultaria em infertilidade e defeitos congênitos nas proles (ALVAREZ e MORAES, 2006).

A adição de vitamina C (2,5 mM) ao diluidor de sêmen bubalino antes da criopreservação foi capaz de elevar a motilidade progressiva do sêmen pós-descongelção (37,5% versus 46,25%) e sua viabilidade (58,12% versus 67,58%), em trabalho de Singh et al. (1996). Ao utilizar diferentes concentrações de vitamina C em sêmen bovino refrigerado, Foote et al. (2002) observaram motilidade espermática de 59% (2,5 mg/L) a 63% (0,5 mg/L), não apresentando diferença significativa do grupo controle, que apresentou motilidade de 63%. Segundo Borges (2003), a vitamina C não apresentou efeitos sobre a motilidade espermática do sêmen bovino congelado-descongelado, quando submetido a teste de termorresistência, sendo a motilidade de 56% versus 57% ao início da incubação, e de 47% versus 50% ao final de três horas de teste, para amostras controle ou tratadas com antioxidantes, respectivamente.

3.4.2 Pentoxifilina

A pentoxifilina é um derivado da metilxantina, tem a característica de inibir a adenosina cíclica 3'-5' monofosfato (AMP) fosfodiesterase. Assim, ocorre aumento nas concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e ativa a adenilciclase, que apresentam efeitos diretos no controle flagelar do espermatozóide. Por isso, a pentoxifilina tem sido utilizada com intuito de estimular a motilidade progressiva espermática e a capacidade fecundante do sêmen (BUNGE, 1973; YOVICH et al., 1988). A pentoxifilina também aumenta a fosforilação de tirosina na cauda espermática, liberando energia para dar início à atividade da dineína ATPase, aumentando o padrão do batimento flagelar. O AMP cíclico exerce um papel fundamental na cinética do espermatozóide e na reação acrossômica. Os tratamentos que elevam as concentrações intracelulares do AMP cíclico incrementam o padrão de movimentação dos espermatozóides e podem elevar as taxas de fertilização. Também acredita-se que a pentoxifilina tenha a propriedade de inativar radicais livres (ESTEVEES et al., 2007).

Na tentativa de minimizar os efeitos provocados pelo estresse térmico causado pela refrigeração do sêmen equino, Goulart et al. (2004) usaram a pentoxifilina (3,6 mM) como um indutor de funcionalidade. A pentoxifilina foi adicionada ao ejaculado diluído e resfriado a 5°C, e melhorou a maioria dos parâmetros espermáticos relacionados à motilidade, provavelmente devido ao aumento da concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos, em especial da adenina monofosfato cíclica (AMPc) e da guanosina monofosfato cíclica (GMPc). A motilidade total do sêmen *in natura* foi de 85,9% e a motilidade progressiva de 37,8%; após 120 minutos de resfriamento a motilidade total decresceu para 32,1% e a progressiva para 14,0%. Após 30 minutos de incubação, o grupo tratado com pentoxifilina apresentou motilidade total de 74,2% e progressiva de 32,8%; após 120 minutos de resfriamento a motilidade total foi de 41,2% e a progressiva de 20,2%. A pentoxifilina incrementou significativamente a taxa de motilidade total em 8,2% e de motilidade progressiva em 4,7% quando comparada ao grupo controle.

O efeito da adição da pentoxifilina e da vitamina C em sêmen criopreservado equino foi estudado por Marques et al. (2002). Esses autores observaram que os melhores resultados de motilidade progressiva após a descongelação foram obtidos com uso de pentoxifilina (52,2%) ou a associação de pentoxifilina e vitamina C (52,7%), quando comparados ao controle (47,7%) e ao uso isolado da vitamina C (47,5%). Após 2 horas de teste de

termorresistência as médias de motilidade progressiva e vigor também foram maiores para pentoxifilina (26,2% e 2) e associação (26,0% e 2), quando comparados a controle (18,7% e 1,67) e vitamina C (16,2% e 1,52).

O efeito da adição de pentoxifilina (5 mM) na criopreservação de sêmen humano foi avaliado por Esteves et al. (2007), que verificaram que a adição do antioxidante elevou significativamente os parâmetros seminais de motilidade total (40,5% versus 55,5%) e de motilidade progressiva (35,5% versus 47%), mas não interferiu estatisticamente nos resultados de integridade de membrana plasmática (76,2% versus 74,6%) e de integridade de acrossoma (79,2% versus 76,2%).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS, LOCAL E PERÍODO DO EXPERIMENTO

Foram utilizados como doadores de sêmen cinco touros bubalinos pertencentes ao rebanho da Embrapa Amazônia Oriental (Foto 1). Os touros foram selecionados de um lote de 16 touros adultos, pré-avaliados por exame andrológico, tendo como critério a maior qualidade espermática apresentada. Os doadores ($5,3 \pm 1,8$ anos e $709,5 \pm 35,5$ Kg) foram mantidos na Embrapa, na Unidade de Pesquisa Animal “Senador Álvaro Adolpho”, em Belém, Pará ($1^{\circ} 25'$ Sul $48^{\circ} 26'$ Oeste), em regime de pastejo em sistema silvipastoril, com acesso à forragem de alta qualidade (*Panicum maximum* cv. Mombaça), cujos piquetes apresentavam áreas com sombreamento natural para descanso. Os animais tiveram acesso constante à água fresca e limpa, além de sal mineral *ad libitum*. Os animais foram vermifugados e vacinados, conforme as exigências do Ministério da Agricultura e as recomendações para bubalinos feitas por Láu (1999). O processamento seminal e as análises laboratoriais foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Amazônia Oriental. O período experimental ocorreu de junho a dezembro de 2009.



Foto 1- Touro bubalino (*Bubalus bubalis*) doador de sêmen, pertencente ao rebanho da Embrapa Amazônia Oriental (Fonte: GARCIA, 2009).

4.2 ASPECTOS ÉTICOS DO EXPERIMENTO

O experimento não utilizou tratamentos diretamente sobre os animais e, sim, sobre material colhido dos indivíduos (sêmen). Portanto, os ejaculados foram as unidades experimentais e receberam os tratamentos pressupostos, no caso, a adição de substâncias antioxidantes. Como doadores de material biológico para pesquisa, os touros foram mantidos dentro dos princípios de boas práticas de produção animal (EMBRAPA, 2006), com direito pleno às cinco liberdades animais, quais sejam: 1) Liberdade fisiológica: animais livres de fome, sede e desnutrição; 2) Liberdade ambiental: animais livres de desconforto; 3) Liberdade sanitária: animais livres de dor, injúria e doença; 4) Liberdade comportamental: animais livres para expressar um comportamento normal; e 5) Liberdade psicológica: animais livres de medo e estresse negativo (PAIXÃO, 2005). As colheitas de sêmen foram realizadas por metodologia vastamente publicada na literatura internacional, de modo seguro e indolor. O protocolo experimental do presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE), da Universidade Federal do Pará, conforme o Anexo A (Parecer CEPAGE BIO 011-10).

4.3 COLHEITA, CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN

As colheitas de sêmen foram realizadas pelo método de “vagina artificial” (BHATTACHARYA, 1962). Foram colhidos seis ejaculados por touro e cada ejaculado (n=30) foi congelado em quatro tratamentos distintos. O primeiro tratamento (grupo Controle) compreendeu a congelação com diluidor TES-TRIS (VALE, 2002). O segundo tratamento (grupo Vitamina C) correspondeu ao uso do diluidor TES-TRIS adicionado de vitamina C (Sigma-Aldrich, cód. 33034-100G) com concentração de 2,5 mM, recomendado por Singh et al. (1996). O terceiro tratamento (grupo Pentoxifilina) correspondeu ao uso do diluidor TES-TRIS associado à pentoxifilina (Sigma-Aldrich, cód. P1784-10G) com concentração de 3,5 mM, de acordo com Marques et al. (2002). O quarto tratamento (grupo Vitamina C + Pentoxifilina) compreendeu o uso do diluidor TES-TRIS associado à vitamina C (2,5 mM) e à pentoxifilina (3,5 mM).

O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL (30×10^6 spz/palheta) e congelado com uso de equipamento programável (TK 3000®, TK Tecnologia em Congelação

Ltda., Uberaba-MG). A curva de congelação usada foi semelhante à descrita para uso em bovinos por Celeghini (2005). As palhetas foram acondicionadas em porta-palhetas metálico para resfriamento, seguindo uma curva de resfriamento de $-0,25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até alcançar $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (aproximadamente 1 hora e 15 minutos). Ao atingir $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, o tempo de equilíbrio adotado foi de 3 horas. Após, o porta-palhetas foi removido para uma caixa térmica contendo nitrogênio líquido, na qual a primeira rampa negativa da curva de congelação foi procedida com uma taxa de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ até $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após alcançar essa temperatura, a segunda rampa negativa foi executada com taxa de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até a temperatura das amostras atingir $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$. A curva de congelação (primeira e segunda rampas) durou, em média, 7 minutos, quando as palhetas foram removidas do porta-palhetas e imersas em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). As palhetas de sêmen foram organizadas em raques e armazenadas em botijão criogênico por, no mínimo, 48 horas. Para as avaliações, a descongelação seminal foi realizada em banho-maria a $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos.

4.4 FASES EXPERIMENTAIS

As avaliações das amostras de sêmen foram realizadas em três diferentes fases de processamento: Fase Pré-Congelação, Fase Pós-Descongelação e Fase Pós-TTR. A Fase Pré-Congelação compreendeu as análises de sêmen *in natura*, imediatamente após a colheita. A Fase Pós-Descongelação compreendeu as análises do sêmen realizadas após o processo de criopreservação e descongelação seminal. Já a Fase Pós-TTR compreendeu as avaliações executadas após a descongelação do sêmen e execução do teste de termorresistência.

As análises imediatas realizadas no sêmen *in natura* (Fase Pré-Congelação) foram pertinentes às características físicas e morfológicas dos ejaculados (Foto 2), e corresponderam à aferição de volume, cor, aspecto, turbilhonamento, concentração do ejaculado, motilidade progressiva, vigor, avaliação de integridade de membrana plasmática e morfologia espermática. Após os processos de congelação-descongelação (Fase Pós-Descongelação) e teste de termorresistência (Fase Pós-TTR), foram realizadas as análises de motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática e morfologia espermática.

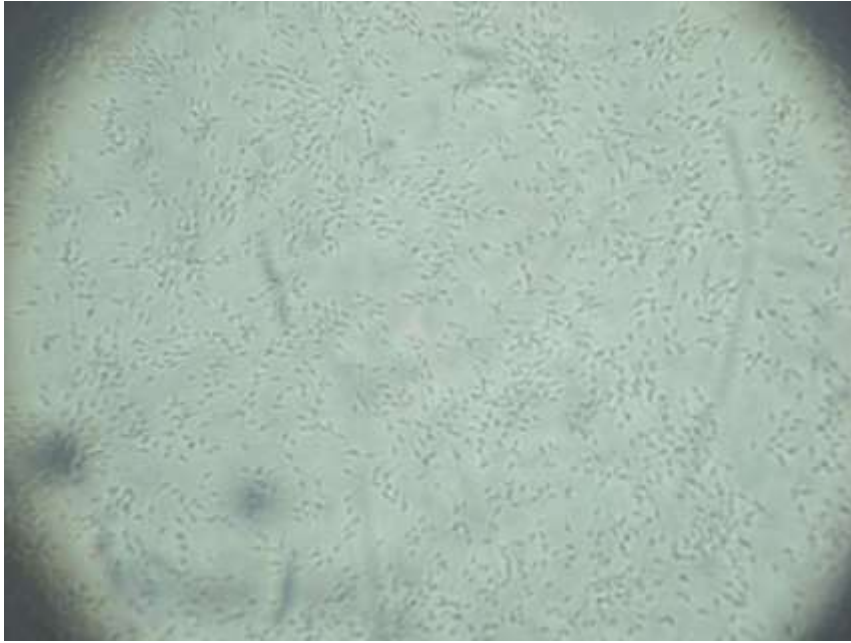


Foto 2- Imagem de microscopia óptica durante avaliação de sêmen bubalino, em aumento de 100x (Fonte: Arquivo pessoal, 2009).

4.5 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MORFOLÓGICAS DO SÊMEN

O volume do sêmen obtido nas colheitas foi aferido em tubo volumétrico (em mL), enquanto a cor e o aspecto foram avaliados em escala visual (VALE, 2002). Para avaliar o turbilhonamento, foi usada como amostra uma gota de 20 μL de sêmen em uma lâmina pré-aquecida, observada com aumento total de 40x, recebendo pontuação em escala de 0 a 5 (0: ejaculado com ausência de ondas e 5: presença de muitas ondas espermáticas, movimentando-se rapidamente), conforme Ohashi (2002). A concentração espermática foi feita por contagem em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. O número total de espermatozóides foi dado em milhões de células por mL (VALE, 2002).

A motilidade espermática foi avaliada por método de microscopia óptica, com aumento total de 100x. Cada amostra de 10 μL de sêmen foi depositada sobre lâmina pré-aquecida e coberta com lamínula, também aquecida. Os resultados foram expressos em porcentagem de células com motilidade progressiva. O vigor foi avaliado na mesma lâmina em que se avaliou a motilidade, sob o mesmo aumento. Sua avaliação foi dada em escala que variou de 0 a 5 (0: ausência ou fraca movimentação espermática até 5: forte movimentação), conforme Ohashi (2002).

Para avaliação da morfologia espermática, as amostras de sêmen foram fixadas em solução de formalina tamponada. Os defeitos estruturais dos espermatozoides foram avaliados em gota úmida, por microscopia de contraste de fase, com aumento total de 1000x (Foto 3). Foram contados e classificados 200 espermatozoides por amostra, sendo que o resultado foi dado em porcentagem de defeitos menores, defeitos maiores e defeitos totais (BLOM, 1973).



Foto 3- Imagem de microscopia de contraste de fase de espermatozoides bubalinos, em aumento de 1000x. No detalhe, espermatozoide normal (N) e espermatozoide com gema protoplasmática proximal (GPP) (Fonte: Arquivo pessoal, 2009).

4.6 INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA

A avaliação de espermatozoides com membrana plasmática íntegra ou lesada foi realizada conforme descrito por Galloway (1974), utilizando solução de eosina-nigrosina (EN), contendo citrato de sódio, eosina a 1% e nigrosina a 5%. Uma gota de sêmen foi misturada a uma gota da solução corante, homogeneizada e após um minuto foi realizado o esfregaço. As lâminas coradas foram observadas em microscópio óptico, sob aumento total de 1000x. Foram contados e classificados 200 espermatozoides por lâmina, de modo que os espermatozoides corados em vermelho ou seus subtons foram classificados como tendo membrana plasmática lesada, enquanto os espermatozoides não corados foram classificados como tendo membrana plasmática íntegra.

A integridade da membrana plasmática dos espermatozóides também foi avaliada pelo teste hiposmótico, conforme Rasul et al. (2000) e Barros et al. (2007). A solução hiposmótica foi preparada com 0,735g de citrato de sódio e 1,351g de frutose para 100 mL de água destilada (pressão osmótica de 190 mOsm kg^{-1}). As amostras para avaliação foram preparadas pela adição de 50 μL de sêmen descongelado a 500 μL da solução hiposmótica. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, uma amostra de 10 μL foi examinada em microscópio de contraste de fase, sob aumento total de 1000x. Duzentos espermatozóides foram contados e classificados, de modo que alterações (curvaturas) na cauda dos espermatozóides após o teste indicaram que a célula apresentava membrana plasmática normal, sendo esta, considerada íntegra do ponto de vista funcional. Já os espermatozóides que não apresentaram curvatura na cauda foram considerados como tendo membrana plasmática lesada.

4.7 TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA (TTR)

O sêmen congelado-descongelado foi avaliado, ainda, após a realização do teste de termorresistência intermediário. Esse teste consistiu na avaliação da motilidade espermática progressiva e do vigor espermático, após submissão da amostra descongelada a 36 °C durante 30 segundos e incubação em banho-maria seco (Digital Dry Bath Incubator, Boekel Scientific®, Feasterville, Estados Unidos) a 36°C, durante 3 horas, o que determina estresse calórico, conforme Severo (2009). Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, ao final do teste, a motilidade e o vigor espermáticos mínimos devem ser de, respectivamente, 20% e 2 (CBRA, 1998).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testar se as variáveis em estudo assumiam distribuição normal ou não, foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para tal, foram elaboradas as seguintes hipóteses ao nível $\alpha=0,05$: H0: A variável em teste assume distribuição normal; H1: A variável em teste não assume distribuição normal. Na etapa de Pré-Congelamento, houveram evidências estatísticas suficientes para a rejeição da hipótese de nulidade ao nível $\alpha=0,05$,

dado $P=0,006$, considerado altamente significativo. Nesta fase, apenas a variável “vigor” não assumiu distribuição normal. Nas etapas de Pós-Descongelação e Pós-TTR, as variáveis “vigor” e “defeitos de acrossoma” não assumiram distribuição normal. A normalização das variáveis foi realizada pela transformação $[\text{Log}(x+1)] \cdot (x+1)$ ou $(x+1)^2$.

Após normalização das variáveis, foi realizada Análise de Variância (ANOVA), para comparações entre tratamentos. No caso do teste ser significativo, para contraste de médias foi aplicado o Teste de Tukey e o teste t pareado, uma vez serem testes adequados para a natureza dos dados em estudo. Para tal foram elaboradas as seguintes hipóteses ao nível $\alpha=0,05$: H0: As médias dos tratamentos são iguais; H1: Pelo menos uma das médias é diferente das demais.

As correlações entre variáveis foram determinadas pelo teste de correlação de Pearson, para avaliar possíveis associações entre elas. Para realização do teste, que é feito em pares, foram elaboradas as seguintes hipóteses ao nível $\alpha=0,05$: H0: Não há associação entre as variáveis; H1: Há associação entre as variáveis.

Para execução das análises estatísticas, nos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e de correlação de Pearson, foi utilizado o programa estatístico SPSS 12, (BRYMAN et al., 2005), enquanto que para as análises de variância foi usado o programa Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO SÊMEN NA FASE PRÉ-CONGELAÇÃO

As características físicas e morfológicas iniciais do ejaculado, ou seja, na Fase Pré-Congelação corresponderam a volume, cor, aspecto, turbilhonamento, concentração, pH, motilidade progressiva, vigor, integridade de membrana plasmática e morfologia espermática dos 30 ejaculados submetidos à congelação, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Características físicas e morfológicas iniciais de ejaculados bubalinos, na Fase Pré-Congelação (n=30). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

Parâmetro	Valor
Volume (mL)	4,5 ± 1,4
Cor	branca ou branco-amarelada
Aspecto	leitoso
Turbilhonamento (0-5)	4 ± 1,3
Concentração (x 10 ⁶ spz/mL)	1.390 ± 572,2
pH	6,0 ± 0,72
Motilidade Progressiva (%)	77,7 ± 6,1
Vigor (0-5)	3,8 ± 0,6
Integridade de Membrana Plasmática/EN (%)	85,4 ± 8,3
Integridade de Membrana Plasmática/HOS (%)	73,1 ± 10,5
Defeitos Menores (%)	9,5 ± 5,2
Defeitos Maiores (%)	15,4 ± 6,9
Defeitos Totais (%)	25,1 ± 7,5

EN: técnica de eosina-nigrosina (Nair et al., 2006); HOS: teste hiposmótico (Rasul et al., 2000).

Os resultados do sêmen *in natura* estão de acordo com as características para sêmen bubalino descritas por Vale (2002), após colheita por vagina artificial, com volume mínimo de 3 mL, vigor mínimo de 3, motilidade superior a 70%, integridade de membrana plasmática

acima de 70% e defeitos totais não superiores a 30%. Os dados de motilidade progressiva média do sêmen *in natura* obtidos foram superiores aos de Barnabe et al. (1994), que relataram valor de 75,0%. São, também, superiores aos parâmetros mínimos desejáveis recomendados pelo CBRA (1998) para sêmen *in natura*, ou seja, motilidade progressiva de 70%, vigor 3, turbilhonamento 3 e total de espermatozoides anormais de 30%, muito embora esses parâmetros sejam extrapolados da espécie bovina para bubalina. Os excelentes indicadores observados no sêmen *in natura* estão relacionados, entre outros aspectos, ao rigor experimental empregado na seleção dos touros doadores e seus ejaculados, pois foram selecionados com base nos critérios técnicos para a criopreservação.

5.2 MOTILIDADE ESPERMÁTICA

Na Fase Pré-Congelação, a motilidade progressiva foi obviamente igual para todos os grupos experimentais, uma vez que se tratava de amostras de sêmen *in natura* que foram aliqüotadas para posterior tratamento com antioxidantes. Já na Fase Pós-Descongelção, observou-se variação numérica entre tratamentos ($P > 0,05$), com motilidade progressiva de $39,5 \pm 23,8\%$ (Controle), $41,9 \pm 22,3\%$ (Vitamina C), $44,6 \pm 19,9\%$ (Pentoxifilina) e $46,9 \pm 19,0\%$ (Vitamina C + Pentoxifilina), conforme o Gráfico 1.

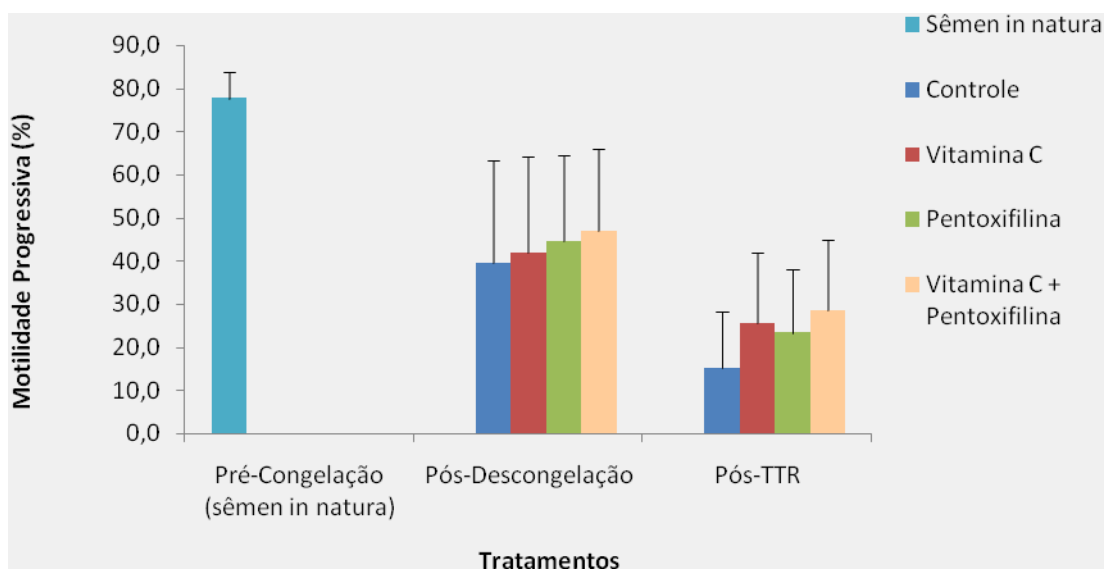


Gráfico 1 - Motilidade progressiva (%) de sêmen bubalino, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

Na Fase Pós-Descongelamento, a motilidade progressiva variou de 39,5 a 46,9%, valores superiores aos de Singh et al. (1996), que observaram motilidade progressiva de 37,5% a 46,25%. Esses valores foram semelhantes aos de Barnabe et al. (1994), que observaram 40,0% de motilidade após a descongelamento, mas permaneceram abaixo dos de Vale et al. (1984), que obtiveram motilidade pós-descongelamento variando de 50 a 60%.

O processo da criopreservação afeta negativamente os espermatozoides, o que interfere no seu metabolismo energético e reduz a motilidade (PICKETT et al., 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995; VALCÁRCEL et al., 1996). Durante a congelamento, observa-se maior produção de ROS (CHATTERJEE e GAGNON, 2001), redução irreversível na motilidade (KARDIVEL et al., 2009) e na capacidade fertilizante dos espermatozoides (GUERRA et al., 2004).

A ação das ROS pode influir negativamente nos parâmetros de cinética espermática, sendo que o peróxido de hidrogênio apresenta função deletéria em relação aos níveis intracelulares de ATP, resultando em diminuição da motilidade dos espermatozoides (ARMSTRONG et al., 1999). As ROS também produzem extensivos danos às proteínas, modificam o citoesqueleto e causam alterações de mecanismos celulares, já que o citoesqueleto proporciona o suporte para as estruturas celulares móveis especializadas, como cílios e flagelos, promovendo sua ativação. As ROS atuam bloqueando sua função, prejudicando a locomoção do espermatozoide (SHARMA e AGARWAL, 1996; AITKEN e BAKER, 2002). Por isso, a adição de substâncias capazes de neutralizar a ação das ROS, pode influenciar positivamente na manutenção ou elevação da motilidade espermática, como observado no presente trabalho.

Na Fase Pós-TTR, a motilidade progressiva apresentou diferença estatística significativa entre tratamentos ($P < 0,05$), conforme indicado na Tabela 2. Nesta fase, o grupo Controle apresentou motilidade progressiva de 15,1%, valor abaixo do recomendado pelo CBRA (1998), que é de 20%. Foi, também, inferior ao resultado de Vale et al. (1984), que obtiveram motilidade espermática próxima de 20% após o TTR. Entretanto, ao incorporar os antioxidantes, os valores de motilidade espermática foram superiores aos recomendados pelo CBRA.

Tabela 2 – Motilidade progressiva (%) de sêmen bubalino, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e incubação. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

FASES	Tratamentos			
	Controle	Vitamina C	Pentoxifilina	Vitamina C + Pentoxifilina
Pré-Congelamento (%)			77,7 ± 6,1	
Pós-Descongelamento (%)	39,5 ± 23,8 a	41,9 ± 22,3 a	44,6 ± 19,9 a	46,9 ± 19,0 a
Pós-TTR (%)	15,1 ± 15,3 a	25,6 ± 16,3b	23,3 ± 14,6 ab	28,6 ± 16,2 b

Valores nas linhas seguidos de letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste ANOVA (P<0,05).

Dessa forma, evidenciou-se que a pentoxifilina apresentou uma discreta elevação da motilidade espermática. Entretanto, quando adicionou-se a vitamina C, isoladamente ou quando associada à pentoxifilina, houve um incremento significativo da motilidade espermática quando comparada ao grupo Controle. A associação da vitamina C à pentoxifilina apresentou os melhores resultados sobre a motilidade espermática, com efeito estatístico altamente significativo quando comparado ao Controle (P<0,01). Esses resultados são similares aos de Marques et al. (2002), que observaram que o uso da associação de vitamina C à pentoxifilina foi capaz de melhorar a motilidade progressiva do sêmen criopreservado. Entretanto, esses autores não obtiveram resultados favoráveis quando utilizaram somente a vitamina C, diferentemente do presente trabalho.

A vitamina C atua protegendo as células espermáticas de danos oxidativos. (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Além disso, a vitamina C é uma das defesas efetivas contra a peroxidação lipídica no plasma seminal, atuando na prevenção da redução da motilidade espermática (ALVAREZ e MORAES, 2006). Esse argumento é corroborado por Singh et al. (1996), que observaram que a adição de vitamina C (2,5 mM) ao diluidor de sêmen bubalino antes da criopreservação foi capaz de elevar a motilidade progressiva do sêmen descongelado, como observado neste presente trabalho.

O incremento da motilidade nas amostras seminais tratadas com antioxidantes pentoxifilina e vitamina C ocorreu, provavelmente, por aumento da concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos, principalmente do AMPc e da guanosina monofosfato cíclica (GMPc), como sugerido por Goulart et al. (2004). Sabe-se que o AMPc interfere na indução da motilidade do flagelo através da fosforilação protéica, liberando energia para iniciar a

atividade da dineína ATPase, responsável pela movimentação flagelar do espermatozóide. Para o aumento do AMPc, a pentoxifilina atua inibindo a fosfodiesterase e ativando a adenilciclase, que apresentam efeitos diretos no controle da cauda do espermatozóide. Por isso, a pentoxifilina tem sido utilizada com intuito de estimular a motilidade progressiva espermática e a capacidade fecundante do sêmen (BUNGE, 1973; YOVICH et al., 1988).

A importância de se melhorar a motilidade progressiva está relacionada ao possível aumento da fertilidade seminal a campo, ou seja, com obtenção de maiores taxas de prenhez após o uso de sêmen criopreservado. Isso pode aumentar a capacidade de multiplicação de material genético superior e promover o melhoramento animal, a partir de material selecionado. De fato, Dhami et al. (1996) relatam taxas de concepção em bubalinos com sêmen congelado-descongelado de 68,1%, ao utilizar sêmen com motilidade de 30%, após incubação por 1 hora a 37 °C. Assim, o presente estudo está de acordo com esses autores, pois os valores obtidos após incubação foram semelhantes. Dados de Barnabe et al. (1994) corroboram essa afirmativa, já que maiores taxas de concepção em bubalinos estão relacionadas ao uso de sêmen com maiores valores de motilidade progressiva, tanto na pós-descongelação, quanto no Pós-TTR. Também em bovinos, Borges (2008) observou taxa de prenhez de 58,7%, ao realizar teste de fertilidade a campo e inseminar matrizes com sêmen criopreservado que apresentara motilidade progressiva média de 51,9% após a descongelação e de 34,5% após o TTR.

No presente trabalho, verificou-se que a motilidade espermática progressiva apresentou decréscimo nos valores durante as diferentes fases do experimento. A motilidade progressiva do sêmen *in natura* foi de 77,7% e decresceu na Fase Pós-Descongelação (de 39,5% a 46,9%) e na Fase Pós-TTR (de 15,1 a 28,6%). Esse evento era esperado, devido ao processamento do sêmen, já que a criopreservação induz a mortalidade das células e afeta negativamente a motilidade progressiva, o que também foi verificado por Pickett et al. (1987), Oba et al. (1993) e Silva et al. (2002).

Nair et al. (2006) sugeriram que o decréscimo de motilidade progressiva observada no sêmen bubalino resfriado é devido à ação das ROS e seus derivados oxidativos, que causam injúrias às células espermáticas e interferem negativamente na motilidade, bem como na ação das enzimas antioxidativas. De fato, os resultados do presente trabalho demonstram que a ação dos antioxidantes incrementou a motilidade espermática progressiva Pós-TTR, sugerindo que os antioxidantes (vitamina C e sua associação à pentoxifilina) foram capazes de agir sobre as ROS, diminuindo sua ação negativa sobre a motilidade espermática.

5.3 VIGOR

Os resultados para vigor espermático estão demonstrados no Gráfico 2. Na Fase Pré-Congelamento, o vigor foi de $3,8 \pm 0,6$. Na Fase Pós-Descongelamento, houve diferença numérica entre os tratamentos ($P > 0,05$), com valores observados de $2,4 \pm 0,6$ (Controle), $2,6 \pm 0,6$ (Vitamina C), $3,1 \pm 0,6$ (Pentoxifilina) e $3,1 \pm 0,6$ (Vitamina C + Pentoxifilina), sendo os maiores valores absolutos obtidos nos grupos Pentoxifilina e Vitamina C + Pentoxifilina. Na Fase Pós-TTR, o vigor caracterizou-se por $2,0 \pm 0,2$ (Controle), $2,1 \pm 0,3$ (Vitamina C), $2,3 \pm 0,4$ (Pentoxifilina) e $2,4 \pm 0,6$ (Vitamina C + Pentoxifilina), também apenas com variação numérica entre tratamentos ($P > 0,05$).

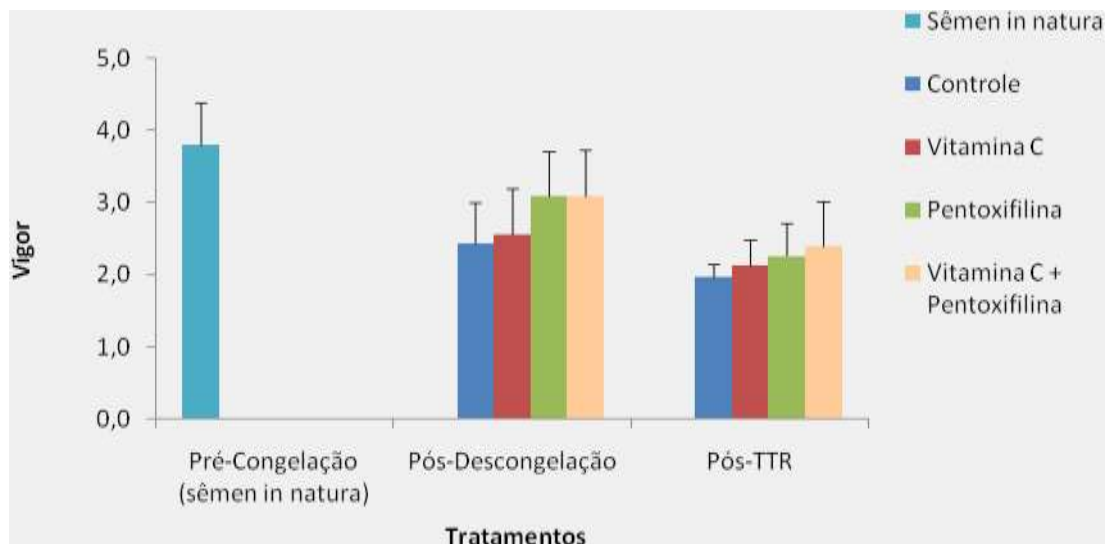


Gráfico 2 – Vigor do sêmen bubalino, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

Os dados para vigor estão de acordo com os padrões do CBRA (1998) para sêmen *in natura* (valor recomendado: 3), após a descongelamento (valor recomendado: 3) e após o TTR (valor recomendado: 2), com exceção do observado nos grupos Controle e Vitamina C, na Fase Pós-Descongelamento, que se encontram abaixo de 3. Os dados de sêmen *in natura* também estão de acordo com Vale (2002), que recomenda valores para vigor acima de 3.

Os dados do presente trabalho corroboram os encontrados por Marques et al (2002), que após TTR de 2 horas observou médias maiores de vigor no sêmen tratado com antioxidantes, sugerindo que a força de movimentação das células foi influenciada pela pentoxifilina, isolada ou em associação com a vitamina C. O vigor aponta para a expressiva

capacidade móvel do espermatozóide, refletindo no potencial fecundante e competência metabólica, como corroborado por Alberts (1997) e Celeghini (2005).

No decorrer das fases experimentais, houve decréscimo nos valores de vigor. Esse fator também era esperado, uma vez que a criopreservação influi negativamente nos padrões de vigor espermático, como demonstrado por Marques et al (2002). Este decréscimo na força do movimento pode estar relacionado com o maior consumo de substratos do meio celular, como a frutose, o que reduz a atividade metabólica espermática no decorrer do processo, fato também relatado por Abdel-Ghaffar et al. (1994). Além disso, ocorre declínio no vigor em função da metabolização de ATP (KAMP et al., 2003).

5.4 INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA

5.4.1 Avaliação com Técnica de Eosina-Nigrosina

A porcentagem de células com membrana íntegra detectada pela técnica de EN na Fase Pré-Congelação foi de $85,4 \pm 8,3\%$, conforme o Gráfico 3. Na Fase Pós-Descongelação, os valores observados foram de $62,2 \pm 15,9\%$ para o grupo Controle, $63,5 \pm 13,3\%$ para o grupo Vitamina C, $57,9 \pm 15,7\%$ para grupo Pentoxifilina e $57,6 \pm 15,9\%$ para Vitamina C + Pentoxifilina ($P>0,05$). Na Fase Pós-TTR, a integridade de membrana foi detectada em $58,0 \pm 13,5\%$ (Controle), $58,3 \pm 13,3\%$ (Vitamina C), $54,0 \pm 14,9\%$ (Pentoxifilina) e $51,8 \pm 15,5\%$ (Vitamina C + Pentoxifilina), sem diferença significativa entre tratamentos ($P>0,05$).

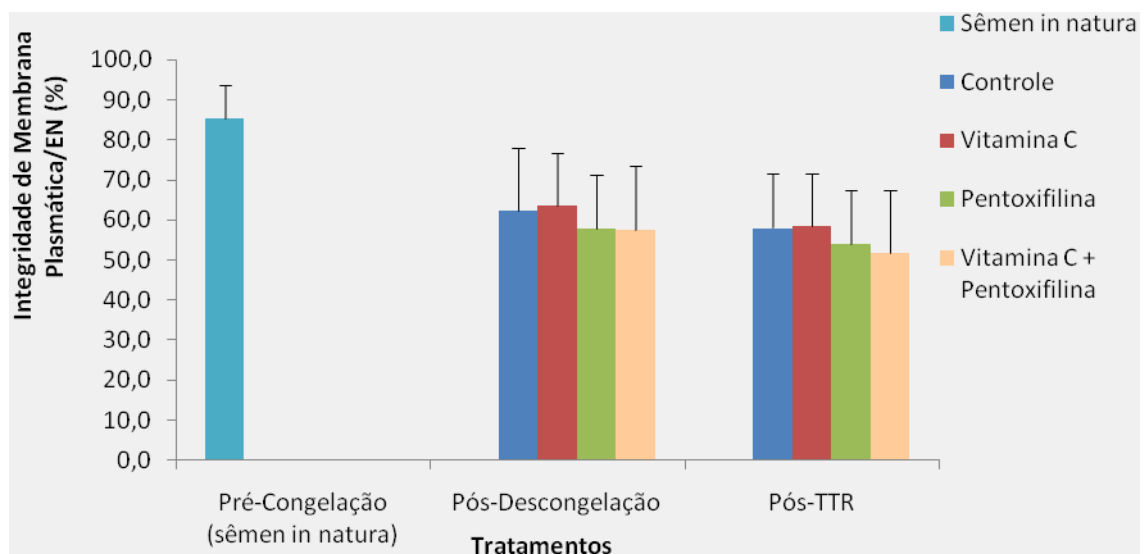


Gráfico 3 – Integridade de membrana plasmática (%) de espermatozoides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelação e após o teste de termorresistência (TTR), avaliada pela técnica de eosina-nigrosina (EN). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

Watson (1995) e Garner et al. (2001) afirmam que o processo de criopreservação danifica as membranas do espermatozóide. Por isso, o uso dos antioxidantes tem sido testado com intuito de reduzir as injúrias causadas pela criopreservação. A ação da vitamina C em sêmen bubalino congelado foi avaliada por Singh et al. (1996), os quais obtiveram significativa preservação da integridade da membrana espermática no sêmen descongelado (controle: 58,12%; vitamina C: 67,58%), com resultados superiores aos observados neste trabalho, onde a vitamina C isoladamente elevou a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra, mas sem apresentar diferença estatística significativa (controle: 62, 2%; vitamina C: 63,5%).

A integridade de membrana plasmática foi reduzida de 85,4% no sêmen *in natura* para 51,8 a 58,3% na Fase Pós-TTR, o que corrobora afirmativa de Oba et al. (1993), os quais relatam que entre 32,5% e 58,8% dos espermatozóides bubalinos tornam-se inviáveis após o processo de congelamento. Identicamente, Silva et al. (2002) verificaram que a criopreservação inviabiliza 42,5% dos espermatozóides para a fecundação. Isto provavelmente está relacionado ao fato que as membranas espermáticas sofrem danos peroxidativos em sua estrutura, determinando perda das funções espermáticas, como também relatado por outros autores (WANG et al., 1997; WATSON, 2000; BALL et al., 2001; SIKKA, 2004).

5.4.2 Avaliação com Técnica do Teste Hiposmótico

A integridade de membrana plasmática analisada pelo teste hiposmótico (HOS) na Fase Pré-Congelamento foi de $73,1 \pm 10,5\%$, conforme Gráfico 4. Na Fase Pós-Descongelamento, os dados apresentaram variação numérica entre os tratamentos ($P > 0,05$), com $87,0 \pm 6,8\%$ de células com membranas íntegras para o grupo Controle, $85,3 \pm 7,6\%$ para Vitamina C, $85,8 \pm 7,0\%$ para Pentoxifilina e $86,7 \pm 6,2\%$ para Vitamina C + Pentoxifilina. Na Fase Pós-TTR, a integridade de membrana caracterizou-se por valores inferiores à Fase Pós-Descongelamento, mas superiores a Fase Pré-Congelamento, com $80,2 \pm 9,0\%$ (Controle), $79,0 \pm 10,6\%$ (Vitamina C), $78,6 \pm 8,8\%$ (Pentoxifilina) e $78,8 \pm 9,0\%$ (Vitamina C + Pentoxifilina).

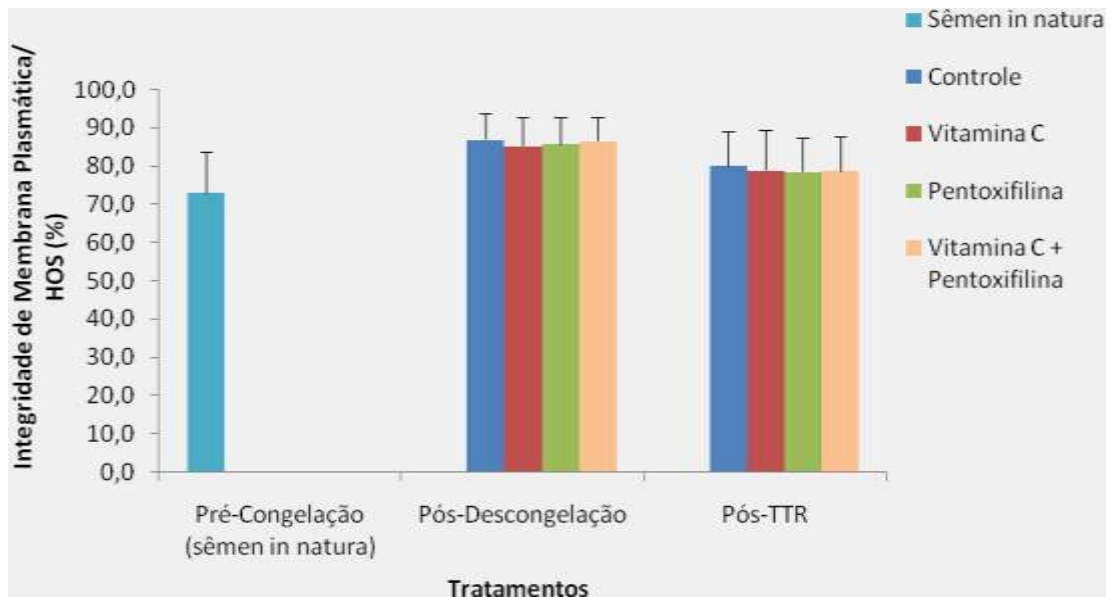


Gráfico 4 – Integridade de membrana plasmática (%) de espermatozoides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e após o teste de termorresistência (TTR), avaliada pelo teste hiposmótico (HOS). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

A porcentagem de células com membrana plasmática íntegra analisadas pelo HOS foi superior ao obtido por Rasul et al. (2000), que relataram 41,4% de células com integridade de membrana plasmática após a descongelamento seminal em bubalinos. Também, foi superior aos dados obtidos por Borges (2008) com sêmen bovino, tanto antes da congelamento (64,8%), quanto após a descongelamento das amostras (48,5%). Isso pode estar relacionado à seleção dos animais doadores no presente trabalho, que foi baseada em parâmetros mínimos espermáticos, o que pode ter favorecido o uso de ejaculados com maior integridade de membrana plasmática.

O decréscimo dos valores de integridade de membrana plasmática entre a Fase Pós-Descongelamento e a Fase Pós-TTR pode estar relacionado à ação das ROS, como observado também por Kardível et al. (2009), os quais afirmam que processos de descongelamento causam danos à membrana plasmática, por ação da peroxidação lipídica.

Os valores de integridade de membrana observados no HOS foram numericamente superiores aos obtidos pela técnica de EN, nas Fases Pós-Descongelamento e Pós-TTR, mas inferiores para o sêmen *in natura*, com valores de 73,1% versus 85,4%, respectivamente. Assim, presume-se que o teste hiposmótico e a técnica de coloração pela eosina-nigrosina possuem capacidades distintas de diagnóstico.

A coloração com eosina-nigrosina depende de realização de esfregaço, homogeneização perfeita entre sêmen e corantes, e execução de procedimentos tintoriais, o que implica em uma série de intervenções sobre as amostras. Já o teste hiposmótico é de execução mais simples e rápida, apresentando menos intervenções técnicas sobre as amostras. Além disso, quando a célula é exposta a condições hiposmóticas, há a entrada da solução através da membrana plasmática para o meio intracelular, até ocorrer o equilíbrio osmótico, sendo que esse processo ocorre somente nas células que possuem a membrana plasmática íntegra (BARROS et al., 2007).

Como o teste de HOS tem como marcador uma alteração morfológica bem evidente (curvatura da cauda espermática) ao invés de uma característica tintorial, sua precisão pode ser maior que a do teste de EN. Ademais, a visualização celular à microscopia de contraste de fase realizada no HOS permite maior detalhamento celular que a microscopia óptica, usada no teste de EN. Por isso, o teste hiposmótico tem sido utilizado em diversas espécies animais e é importante para diagnosticar alterações de funcionalidade espermática, as quais não seriam percebidas apenas nas avaliações de motilidade e morfologia espermáticas (RASUL et al., 2000; BARROS et al., 2007).

5.5 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

5.5.1 Defeitos Menores

Na Fase Pré-Congelação, os defeitos menores observados totalizaram $9,5 \pm 5,2\%$. Na Fase Pós-Descongelção, houve pequena redução numérica ($P > 0,05$) para o sêmen tratado com vitamina C e com a associação da vitamina C e pentoxifilina, em relação ao Controle e tratado somente com pentoxifilina. Os valores obtidos foram de $3,0 \pm 2,2\%$ (Controle), $2,3 \pm 1,8\%$ (Vitamina C), $2,9 \pm 2,2\%$ (Pentoxifilina) e $2,5 \pm 2,2\%$ (Vitamina C + Pentoxifilina). Na Fase Pós-TTR, os valores foram de $3,6 \pm 2,1\%$ para o grupo Controle, $3,7 \pm 2,2\%$ para Vitamina C, $3,5 \pm 2,4\%$ para Pentoxifilina e $3,2 \pm 1,6\%$ para Vitamina C + Pentoxifilina ($P > 0,05$).

Os valores de defeitos menores decresceram da Fase Pré-Congelação para Pós-Descongelção, e apresentaram pequeno acréscimo da Fase Pós-Descongelção para a Pós-TTR, como observado no Gráfico 5. Observa-se que na Fase Pré-Congelação, os valores das patologias menores foram mais elevados que nas demais fases. Isto possivelmente ocorreu

porque, nas fases subsequentes, houve incremento no número de patologias maiores resultante dos processos de criopreservação (WATSON, 1995; GARNER et al., 2001) e incubação, e como a técnica de classificação adotada prioriza os defeitos maiores em relação aos defeitos menores, células que apresentavam defeitos das duas categorias foram computadas como portadoras de defeito maior.

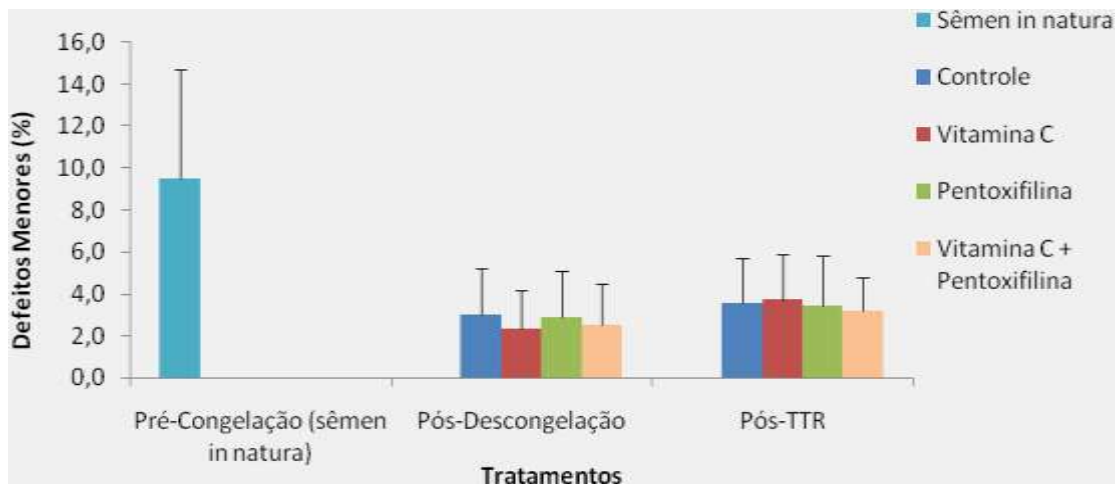


Gráfico 5 – Frequência de defeitos menores (%) em espermatozoides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

5.5.2 Defeitos Maiores

Os defeitos maiores apresentam maior importância, do ponto de vista da qualidade seminal, em relação aos defeitos menores, de acordo com BLOM (1973). Na Fase Pré-Congelação, os valores observados de defeitos maiores foram de $15,4 \pm 6,9\%$, como demonstrado no Gráfico 6. Na Fase Pós-Descongelação, os dados apresentaram variação numérica ($P > 0,05$) de $34,7 \pm 15,6\%$ (Controle), $36,8 \pm 17,2\%$ (Vitamina C), $36,3 \pm 18,5\%$ (Pentoxifilina) e $34,7 \pm 18,3\%$ (Vitamina C + Pentoxifilina). Na Fase Pós-TTR, os valores foram de $38,3 \pm 17,9\%$ para o grupo Controle, $39,2 \pm 17,6\%$ para Vitamina C, $38,6 \pm 17,9\%$ para Pentoxifilina, $38,1 \pm 16,1\%$ para Vitamina C + Pentoxifilina, sem diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

Na Fase Pós-Descongelação os valores de defeitos maiores apresentaram diferença numérica desfavorável aos tratamentos com Vitamina C e com Pentoxifilina, e com resultados

numericamente iguais entre Controle e Vitamina C + Pentoxifilina. Isto provavelmente ocorreu pela menor ação das ROS na morfologia espermática, promovendo proteção celular. Guerra et al. (2004) e Gadea et al. (2007) afirmam que a ação de substâncias antioxidantes, como vitamina C e pentoxifilina, promovem proteção às células espermáticas de diversas espécies animais. Na Fase Pós-TTR, a diferença numérica apresentada entre os grupo foi de aproximadamente 1%, considerada pouco relevante.

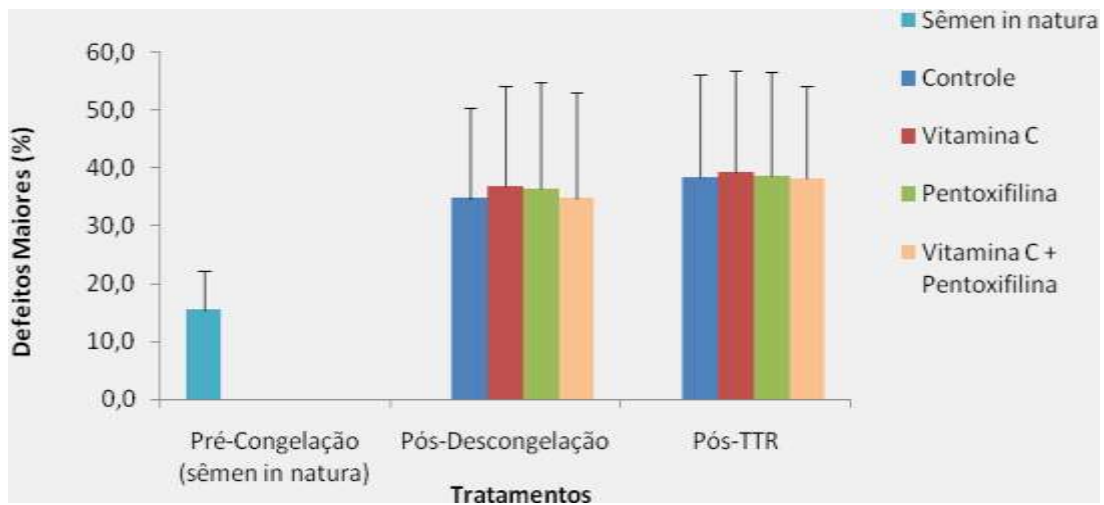


Gráfico 6 – Frequência de defeitos maiores (%) em espermatozoides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

Durante as fases experimentais, os dados das patologias maiores apresentaram acréscimo. Isto está relacionado ao processamento do sêmen, que causa injúrias às células espermáticas, como afirmado por Hammerstedt et al. (1990), Watson (1995) e Kardivel et al. (2009). Dentre os defeitos maiores, algumas anormalidades merecem ser observadas isoladamente, pois podem interferir diretamente com a capacidade de fecundação ou de movimentação celular, como por exemplo, os defeitos de acrossoma e de peça intermediária. A ocorrência desses defeitos está demonstrada nos Gráficos 7 e 8.

Os valores de defeitos de acrossoma na Fase Pré-Congelamento foram de $1,1 \pm 0,8\%$, resultado igual ao percentual de defeitos de acrossoma obtido em bubalinos por Koonjaenak et al. (2007), que foi de 1,1%. Na Fase Pós-Descongelamento, os dados não apresentaram diferença estatística significativa ($P > 0,05$), sendo de $0,4 \pm 0,6\%$ (Controle), $0,4 \pm 0,6\%$ (Vitamina C), $0,5 \pm 0,6\%$ (Pentoxifilina) e $0,6 \pm 0,5\%$ (Vitamina C + Pentoxifilina). Na Fase Pós-TTR, os valores foram de $0,7 \pm 0,7\%$ para o grupo Controle, $0,6 \pm 0,6\%$ para Vitamina C,

0,7 ± 0,6% para Pentoxifilina e 0,6 ± 0,6% para Vitamina C + Pentoxifilina, sem diferença estatística significativa ($P>0,05$).

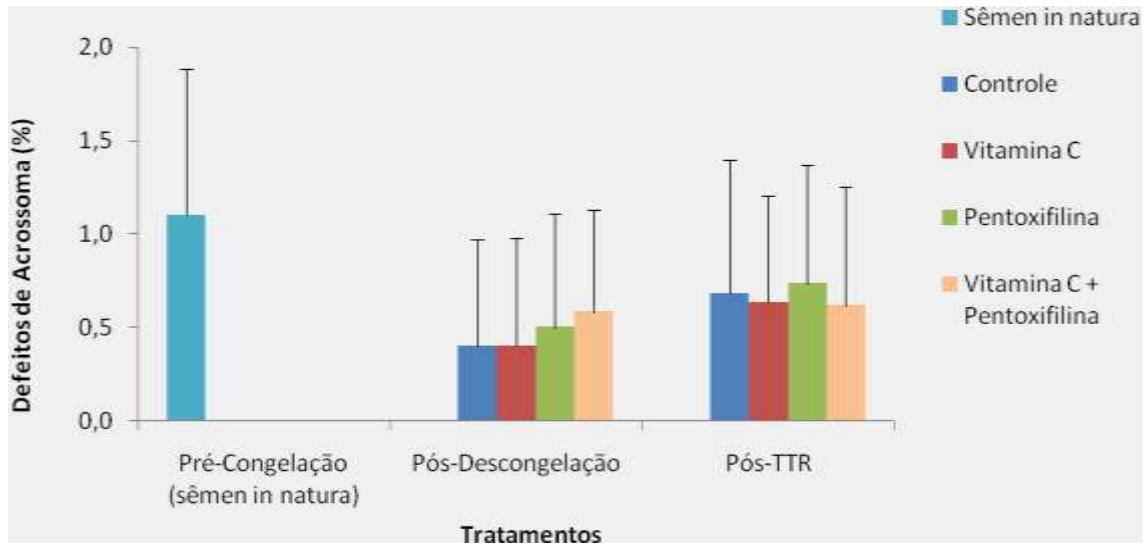


Gráfico 7 - Frequência de defeitos de acrossoma (%) em espermatozoides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelamento e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

Dados diferentes do presente trabalho foram obtidos por Rasul et al. (2000), que observaram 46,8% de células com acrossomas lesados após a descongelamento de sêmen bubalino, o que foi atribuído à ativação espermática e sua capacitação. Possivelmente, um efeito adicional dos antioxidantes foi a redução da ação das ROS sobre a morfologia espermática, e, conseqüentemente, menores taxas de defeitos de acrossoma e de capacitação espermática. Esses achados estão de acordo com os de Roy e Atreja (2008), que observaram experimentalmente que as ROS, principalmente os radicais ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são potentes indutores da capacitação espermática no sêmen bubalino, e a ação antioxidante pode inibir esses radicais, reduzindo a porcentagem de defeitos de acrossoma e favorecendo a capacitação no momento ideal.

Os defeitos de peça intermediária na Fase Pré-Congelamento foram de $9,3 \pm 5,0\%$. Na Fase Pós-Descongelamento, os dados não apresentaram diferença estatística significativa ($P>0,05$), sendo de $32,3 \pm 16,3\%$ (Controle), $34,5 \pm 17,6\%$ (Vitamina C), $34,3 \pm 18,8\%$ (Pentoxifilina) e $32,5 \pm 18,6\%$ (Vitamina C + Pentoxifilina). Na Fase Pós-TTR, os valores foram de $35,5 \pm 18,2\%$ para o grupo Controle, $36,8 \pm 17,6\%$ para Vitamina C, $36,0 \pm 18,0\%$ para Pentoxifilina e $35,0 \pm 16,5\%$ para Vitamina C + Pentoxifilina, sem diferença estatística significativa ($P>0,05$).

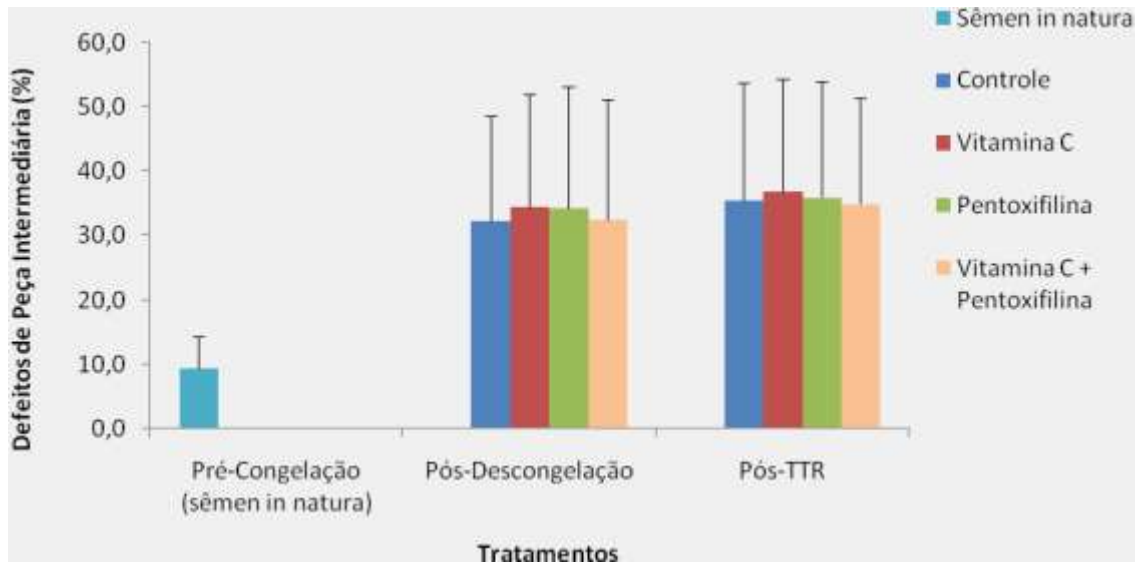


Gráfico 8 – Frequência de defeitos de peça intermediária (%) em espermatozoides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelação e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

Os valores observados nos defeitos de peça intermediária representaram quase integralmente os defeitos totais presentes nos ejaculados após a criopreservação. A maior frequência deste defeito pode estar relacionada à ação física do processo de criopreservação, conforme descrito por Hammerstedt et al. (1990) e Watson (1995), o que pode induzir excessiva curvatura de peças intermediárias, com impactos negativos sobre a motilidade. Outro fator que pode ter aumentado a frequência de defeitos de peça intermediária seria a ação das ROS, cuja produção está relacionada diretamente com patologias de acrossoma e de peça intermediária (GOMEZ et al., 1998). Contudo, no presente trabalho, não se observou acréscimo nos defeitos de acrossoma. Deve-se observar que os espermatozoides morfológica e funcionalmente anormais são fontes de ROS, pois os seus sistemas antioxidantes estão inativos, como descrito por Rhemrev et al. (2001).

5.5.3 Defeitos Totais

Na Fase Pré-Congelação, os valores de defeitos totais foram de $25,1 \pm 7,5\%$. Na Fase Pós-Descongelação, houve apenas variação numérica entre tratamentos ($P > 0,05$), sendo os valores obtidos de $37,7 \pm 14,9\%$ (Controle), $39,2 \pm 16,8\%$ (Vitamina C), $39,2 \pm 18,3\%$ (Pentoxifilina) e $37,5 \pm 17,5\%$ (Vitamina C + Pentoxifilina). Na Fase Pós-TTR, o total de

defeitos espermáticos observados foi de $41,8 \pm 17,4\%$ (Controle), $42,9 \pm 17,0\%$ (Vitamina C), $42,1 \pm 18,0\%$ (Pentoxifilina) e $41,3 \pm 17,5\%$ (Vitamina C + Pentoxifilina), também sem diferença significativa ($P > 0,05$), conforme o Gráfico 9.

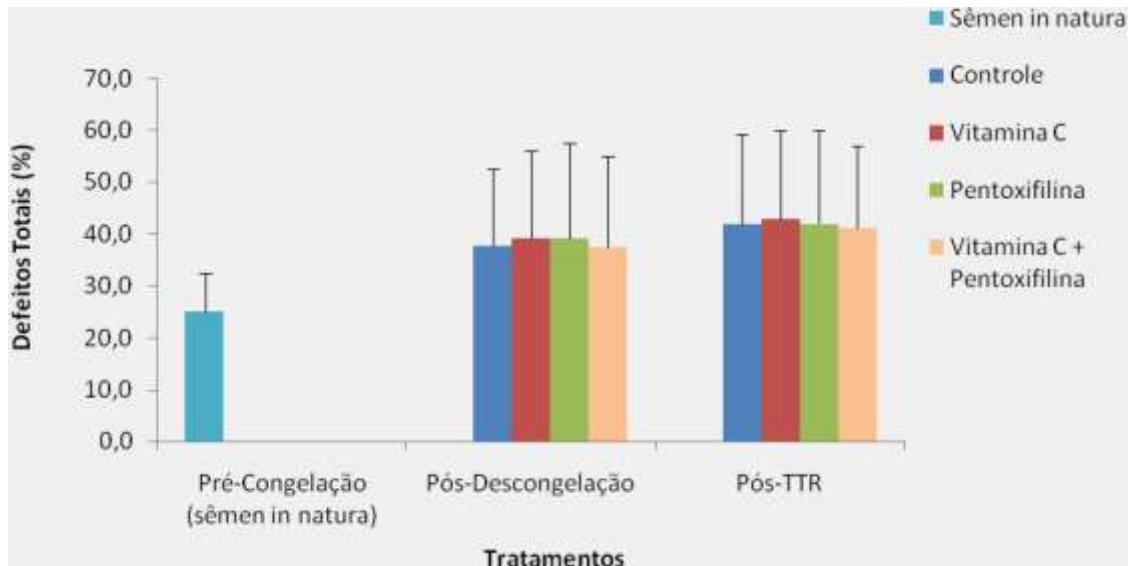


Gráfico 9 – Frequência de defeitos totais (%) em espermatozoides bubalinos, com ou sem adição de antioxidantes, em diferentes fases do processo de congelação e após o teste de termorresistência (TTR). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

Observou-se que os defeitos totais foram crescentes em decorrência da congelação e da incubação. Este fato pode ser explicado pelos choques térmico e osmótico ocorridos durante o processo de criopreservação, os quais podem causar danos irreversíveis aos espermatozoides, devido à formação de cristais de gelo intracelular, que afetam a estrutura física da célula, conforme afirmam Hammerstedt et al. (1990). A criopreservação também afeta negativamente a fertilidade, pois interfere na motilidade progressiva, o que reduz o tempo de sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea (PICKETT et al., 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; VALCÁRCEL et al., 1996). Assim, apesar de não ter sido observado decréscimo nos defeitos espermáticos em decorrência do uso de antioxidantes, a preservação da normalidade morfológica é importante, por ter relação direta com a fertilidade, conforme também observado por Watson (2000). Além disso, outro fator que influencia na presença de defeitos nos espermatozoides é o efeito do acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo celular e o aumento da produção de ROS, efeitos verificados também por Rhemrev et al. (2001) e Guerra et al. (2004).

Os valores observados para defeitos totais, independentemente do tratamento, foram superiores aos recomendados pelo CBRA (1998), o qual define como sendo de 30% o nível máximo para sêmen congelado bovino. Isso pode significar que o sêmen bubalino apresente uma sensibilidade maior ao choque pelo frio, como afirmam Miska et al. (1994) e Vale (2002), para quem esta sensibilidade é devida a fatores intrínsecos e a diferenças bioquímicas, quando comparado ao bovino. Essa maior sensibilidade justificaria o estabelecimento pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal de padrões específicos para a avaliação e processamento do sêmen bubalino.

5.6 CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS

As correlações de Pearson observadas entre as características físicas e morfológicas dos ejaculados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Correlações estatísticas entre características espermáticas de sêmen bubalino, com ou sem adição de antioxidantes, em todas as fases do processo de congelamento e incubação (n=360). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

Correlações	Motilidade Progressiva	Vigor	Integridade de Membrana/ EN	Integridade de Membrana/ HOS	Defeitos Menores	Defeitos Maiores	Defeitos Totais
Motilidade Progressiva	1,000	0,730*	0,557*	-0,395*	-0,649*	-0,714*	0,521*
Vigor	-	1,000	0,548*	-0,282*	-0,349*	-0,458*	0,546*
Integridade de Membrana/ EN	-	-	1,000	-0,033	-0,065	-0,173*	0,496*
Integridade de Membrana/ HOS	-	-	-	1,000	0,566*	0,582*	-0,320*
Defeitos Menores	-	-	-	-	1,000	-0,488*	-0,258*
Defeitos Maiores	-	-	-	-	-	1,000	0,956*
Defeitos Totais	-	-	-	-	-	-	1,000

Valores calculados pelo teste de correlação de Pearson.

*P<0,001

Foram observadas correlações negativas, de baixa intensidade e não significativas entre integridade de membrana/EN e os defeitos menores ($r=-0,065$) e entre as técnicas de avaliação de integridade de membrana por coloração de eosina-nigrosina e pelo teste

hiposmótico ($r=-0,033$). As outras variáveis apresentaram correlação altamente significativa ($P<0,001$).

A alta correlação entre a motilidade progressiva e vigor era esperada ($r=0,730$; $P<0,001$), e pode ser biologicamente explicada pela produção de ATP mitocondrial, que provê a energia necessária para o movimento flagelar e para a força deste movimento, resultando em maiores taxas de motilidade e vigor (ALBERTS, 1997; KAMP et al., 2003; CELEGHINI, 2005). Assim, quanto maior a disponibilidade de energia, maior serão a motilidade e o vigor do ejaculado. Em condições normais, o sêmen possui substâncias como fonte de energia, como a frutose, que é o principal nutriente dos espermatozóides (JONES e CONNOR, 2000). Em condições adversas, como em processos de incubação, as células espermáticas passam a consumir a frutose presente, e quando sua disponibilidade diminui, os espermatozóides reduzem seu metabolismo, refletindo negativamente na motilidade, no vigor e na fertilidade (ABDEL-GHAFFAR et al., 1994).

Ao correlacionar motilidade progressiva e defeitos maiores ($r=-0,714$), observou-se uma correlação negativa e significativa ($P<0,001$). Esse efeito pode ser explicado porque as patologias espermáticas impactam negativamente na qualidade seminal, interferindo diretamente na capacidade de movimentação do espermatozóide e, conseqüentemente, reduzem a motilidade espermática, o que inviabiliza o uso do ejaculado. A presença de patologias espermáticas também está relacionada com a produção das ROS (GOMEZ et al., 1998). A correlação positiva e significativa ($r=0,956$; $P<0,001$) entre defeitos maiores e defeitos totais ocorreu porque a primeira variável é parte componente da segunda, e sua magnitude deveu-se ao fato de que no presente estudo os defeitos maiores foram muito mais freqüentes que os menores na composição de defeitos totais.

Quando se buscou analisar separadamente por tratamento as correlações entre as variáveis de resposta, os mesmos padrões de correlações foram mantidos. Portanto, na análise por tratamentos, apenas três correlações apresentaram correlações de magnitude maior que 0,65, conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Correlações de Pearson observadas entre características espermáticas de sêmen bubalino, em decorrência dos tratamentos, com ou sem adição de antioxidantes, em todas as fases do processo de congelamento e incubação (n=360). Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2010.

Correlações	Tratamentos			
	Controle	Vitamina C	Pentoxifilina	Vitamina C + Pentoxifilina
Motilidade Progressiva X Vigor	0,801*	0,740*	0,697*	0,649*
Motilidade Progressiva X Defeitos Maiores	-0,699*	-0,706*	-0,724*	-0,755*
Motilidade Progressiva X Defeitos Totais	0,964*	0,775*	0,966*	0,962*

Valores calculados pelo teste de correlação de Pearson.

*P<0,001

Nesse contexto, observando as correlações existentes entre as características de motilidade espermática, vigor, defeitos maiores e defeitos totais, pode-se pressupor que os antioxidantes, ao atuarem como a principal defesa contra o estresse oxidativo induzido por radicais livres e elevar a motilidade durante o período de incubação, podem ter um efeito favorável indireto sobre o vigor e o total de defeitos.

Mesmo que se percebam efeitos positivos no uso de antioxidantes quando adicionados diretamente no sêmen a ser criopreservado, ainda não há consenso quanto à dosagem e ao tipo de antioxidante ideal para a proteção de espermatozóides nas diferentes espécies, em especial na espécie bubalina, pois poucas pesquisas foram realizadas. Talvez pelo fato desta ser uma espécie que apresente células mais sensíveis ao processo de criopreservação, os efeitos dos antioxidantes nas concentrações utilizadas não foram capazes de sobrepujar a ação deletéria da criopreservação sobre a estrutura celular.

6. CONCLUSÕES

A adição no diluidor de sêmen bubalino dos antioxidantes vitamina C e pentoxifilina, e sua associação, foi capaz de incrementar numericamente os parâmetros de motilidade e vigor, e diminuir a incidência de defeitos menores após o processo de criopreservação.

O uso da vitamina C isolada ou em associação à pentoxifilina foi capaz de incrementar significativamente a motilidade espermática progressiva após realização do teste de termorresistência.

Os antioxidantes vitamina C e pentoxifilina, e sua associação, não incrementaram os parâmetros espermáticos de vigor, integridade de membrana plasmática e morfologia, no sêmen bubalino, após o teste de termorresistência.

Houve correlações significativas existentes entre motilidade e vigor, motilidade e defeitos maiores, motilidade e defeitos totais, nas amostras tratadas com antioxidantes, o que pode indicar efeitos positivos indiretos destes sobre o vigor e o total de defeitos.

O uso dos antioxidantes vitamina C (2,5 mM) ou vitamina C + pentoxifilina (2,5 mM + 3,5 mM) no sêmen bubalino pode ser recomendado, como forma de aumentar sua potencial fertilidade e maximizar a disseminação de material genético superior.

Outros estudos com diferentes concentrações e formas de uso dos antioxidantes avaliados devem ser executados, para se elevar o cabedal de informações sobre outros parâmetros espermáticos e sobre a fertilidade.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL-GHAFFAR, A. E.; EL-AZAB, A. I.; EL-DAWY, K. H. Rabbit semen metabolism. **CIHEAM - Options Mediterraneennes**, v.8, p.305-312, 1994.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID, T. M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of Andrology**, v.26, n.6, p.654-660, 2005.

AHMAD, K.; CHAUDHRY, R. A. Cryopreservation of buffalo semen. **The Veterinary Record**, v.106, p.199-201, 1980.

AITKEN, R.; BAKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v.25, p.191-194, 2002.

ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 3 Ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294p.

ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. Efeitos da selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **Revista Saúde e Biologia**, v.1, n.1, p.42-51, 2006.

ARMSTRONG, J. A.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTORM, W. J.; SIKKS, S. C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.7/8, p.869-880, 1999.

ARRUDA, R. P.; BARNABE, V. H.; ALENCAR, M. M.; BARNABE, R. C. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, n.1, p.131-137, 1992.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E.C.C.; SOUZA, LWO; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, AFC.; RAPHAEL, CF.; GARCIA, AR. 2005. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.145-150, 2005.

AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M. A.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 5.0 - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: Mamirauá, 2007. 319p.

BALL, B. B.; VO, A. T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.508-515, 2001.

BARNABE, V. H.; BARUSELLI, P.; BARNABE, R. C.; SILVA, E. O. T. R.; VISINTIN, J. A. Artificial insemination of buffaloes using two different diluents. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, IV, v. 3, 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 1994, p.547-548.

BARROS, P. M. H.; NICHI, M.; CORTADA, C. N. M.; CARVALHO, N. A. T.; BARUSELLI, P. S.; BARNABE, R. C.; BARNABE, V. H. Semen evaluation of Murrah buffalo bulls using sperm functional tests. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 8, v.6, 2007, Caserta-Itália. **Proceedings...** Caserta, 2007, p.772-774.

BARUSELLI, P. S.; VALE, W. G. Inseminación Artificial de la Hembra Bufalina. In: Gustavo A. Palma. (Org.). **Biotechnología de la Reproducción**. 2 Ed. Mar del Plata: Producción Gráfica Integral, 2008, v.1, p.653-662.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.24, p.621-628, 2003.

BHATTACHARYA, P., SRIVASTAVA, P. N. Studies in deep freezing of buffalo semen. In: INDIAN SCIENCE CONGRESS, 42, v.3, 1955, Baroda-Índia. **Anais...** Baroda: ISC, 1955, p.348.

BHATTACHARYA, P. Artificial insemination in the water buffalo. In: **The semen of animals and artificial insemination**. Maule, J. P. (editor), C. A. B., Farnham Royal, 1962, p.184-204.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification on the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v.25, n.7-8, p.383-391, 1973.

BORGES, J. C. **Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificante na criopreservação do sêmen bovino**. Viçosa, 2003.73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária. Universidade Federal de Viçosa. 2003.

BORGES, J. C. **Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro***. Jaboticabal, 2008.70 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.

BREZEZINSKA-STEVBODZINSKA, F.; SLEBODZINSKI, A. B.; PRIETAS, B.; WIEZOREK, G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, v.47, p.69-74, 1995.

BRYMAN, A.; CRAMER, D. **Quantitative data analysis with SPSS 12 and 13: a guide for social scientist**. 1 Ed. USA: Routledge, 2005. 368p.

BUNGE, R. G. Caffeine stimulation of ejaculated human spermatozoa. **Urology**, v.1, p.371-376, 1973.

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.93-99, 2008.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovinos sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. São Paulo, 2005.186 p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Departamento de Reprodução Animal. Universidade Federal de São Paulo. 2005.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction Development**, v.59, p.451-458, 2001.

CHOHAN, K. R.; IQBAL, J.; ASGAR, A. A.; CHAUDHRY, M. A. Fertility of liquid and frozen semen in Nili Ravi buffaloes. **Pakistan Veterinary Journal**, v.12, p.4-5, 1992.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v.10, n.1, p.15-21, 1995.

DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G. ; JANI, V. R. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. **Theriogenology**, v.46, n.1, p.109-120, 1996.

DONNELLY, F. T.; McCLURE, N.; LEWIS, S. F. M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v.72, p.484-486, 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Boas práticas agropecuárias – bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2006. 82p.

ESTEVES, S. C.; SPAINE, D. M.; CEDENHO, A. P. Effects of pentoxifylline treatment before freezing on motility, viability and acrosome status of poor quality human spermatozoa cryopreserved by the liquid nitrogen vapor method. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, n.7, p.985-992, 2007.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **FAOSTAT: Agriculture**, 2005. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat/collections>>. Acesso: 30 abril 2005.

FOOTE, R. H. BROCKETT, C. C.; KAPROTH, M. T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.13-23, 2002.

GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M. A.; 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.

GADEA, J.; GUMBAO, D.; CÁNOVAS, S.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A.; GRULLÓN, L. A.; GARDÓN, J. C. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.31, p.40-49, 2007.

GALLOWAY, D. B. Introductory review, factors affecting fertility. **In: Bulls Course held**. The University of Queensland Veterinary School, 1974, p.2-23.

GARCIA, A. R., GONÇALVES, K. S., NAHÚM, B. S., MATOS, L. B., BARBOSA, D. L. M., SIMÕES, A. R., MONTEIRO, P. J. C. Eficiência da detecção de estros em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*) criadas na Amazônia. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17, 2006, Gramado. **Anais...** Gramado: SOVERGS, 2006. p.3051-3056.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; GRAVANCE, C. G.; MARSHALLB, C. E.; DEJARNETTE, J. M.; ALLENC, C. H. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect

in bovine sperm. **Theriogenology**, v.56, p.31-40, 2001.

GAVELLA, M.; LIPOVAC, V. NADH-dependent oxido-reductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm infertile men. **Archives of Andrology**, v.28, p.135-141, 1992.

GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, v.21, p.81-94, 1998.

GOODRICH, R. P.; BALDESCHWEILER, J. D. The cryoprotective action of synthetic glycolipids. **Cryobiology**, v.28, p.327-334, 1991.

GOULART, H. M.; SILVA, A. E. D. F.; MACMANUS, C.; PAPA, F. O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozoides de equinos, após o resfriamento a 5 °C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p.112-122, 2004.

GRIVEOU, J. F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **Internacional Journal of Andrology**, v.20, p.61-69, 1997.

GUERRA, M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, v.28, n.4, p.187-195, 2004.

GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1811-1816, 2002.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v.91, p.14-22, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 Ed. New York: Oxford University Press, 1999. 936p.

HAMMADEH, M. E., AL HASANI, S.; ROSENBAUM, P.; SCHMIDT, W., FISCHER-HAMMADEH, C. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v.277, n.6, p.515-526, 2008.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Criopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, n.1, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Agropecuário 2006**. Rio de Janeiro: IBGE, 2009, 777p.

JONES, A. R.; CONNOR, D. E. Fructose metabolism by mature boar spermatozoa, **Reproduction Fertility Development**, v.12, p.355-359, 2000.

JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. J. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v.31, p.531-537, 1979.

KAMP, G.; BUSSELMANN, G.; JONES, N.; WIESNER, B.; LAUTERWEIN, J. Energy metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. **Reproduction**, v.126, p.517-525, 2003.

KARDIVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.125-134, 2009.

KLINC, P.; FRESE, D.; OSMERS, H.; RATH, D. Insemination with sex sorted fresh bovine spermatozoa processed in the presence of antioxidative substances. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, n.1, p.58-62, 2007.

KOONJAENAK, S.; CHANATINART, V.; EKWALL, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Morphological features of spermatozoa of swamp buffalo AI bulls in Thailand. **Journal of Veterinary Medicine**, v.54, p.169-178, 2007.

KUMAR, S.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G. Effect of yolk, glycerol and sugars on post-thaw survival of buffalo spermatozoa in TRIS dilutor. **Indian Journal Animal Science**, New Delhi, v.64, n.4, p.362-364, 1994.

KUMAR, S.; MILLAR, J. D.; WATSON, P. F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p.24-53, 2003.

LÁU, H. D. **Doenças em búfalos no Brasil - diagnósticos, epidemiologia e controle**. Belém: Embrapa-CPATU, 1999. 200p.

LIU, Z.; FOOTE, H. R.; BROCKETT, C. C. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. **Cryobiology**, v.37, p.219-230, 1998.

MACLEOD, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. **American Journal of Physiology**, v.138, p.512-518, 1943.

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

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Oxidative stress & male infertility. **Indian Journal of Medical Research**, v.129, p. 357-367, 2009.

MARQUES, A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GOBESSO, A. A. O.; NEVES NETO, J. R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v.58, p.257-260, 2002.

MARTI, E.; MARTI, J. I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.29, n.4, 2008.

MISKA, A. K.; PATEL, S. H.; JOSHI, B. V; JAISWAL, R. S.; TRIVEDI, K. R. Buffalo semen characteristics and its freezability under Indian conditions. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, 1994, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo: FAO/FINEP, 1994. p.156-171.

NAIR, S. J.; BRAR, A. S.; AHUJA, C. S.; SANGHA, S. P. S.; CHAUDHARY, K. C. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.21-29, 2006.

NORBERG, J.; ÁRNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thiredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.

NUNES, J. F. Utilização da água de coco em pó (ACP) em processos biotecnológicos. 2004. Disponível em: <<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv>>. Acesso em: 16 setembro 2007.

OBA, E.; FUCK, E. J.; BICUDO, S. D.; PAPA, F. O.; OHASHI, O. M. Estudo preliminar de diferentes meios para congelamento de sêmen de búfalo. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 10, 1993, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993. p.337.

OHASHI, O. M. Inseminação Artificial em Bubalinos. In: GONÇALVES, P. B.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.103-123.

OHASHI, O. M.; MIRANDA, M. S.; SOUSA, J. S.; SOUSA, A. J. O.; CORDEIRO, M. S.; BIONDI, F. C. Produção *in vitro* de embrião bubalino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, 2003.

PAIXÃO, R. L. É possível garantir bem-estar aos animais de criação? **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.11, n.36, p.66-73, 2005.

PAPA, F. O.; GABALDI, S. H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservado com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.24, n.1, p.39-44, 2000.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v.29, p.255-266, 1992.

PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L.; MACKINNON, A. O. **Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination**. Bulletin n.3. Fort Collins, CO: Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory, 1987. 125p.

RASUL, Z.; ANZAR, M.; JALALI, S.; AHMAD, N. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.59, p.31-41, 2000.

RHEMREV, J. P. T.; VERMEIDEN, J. P. W.; HAENEN, G. R. M.; DE BRUIJNE, J. J.; REKERS-MOMBARG, L. T. M.; BAST, A. Progressively motile human spermatozoa are well. Protected against *in vitro* lipid peroxidation imposed by induced oxidative stress. **Andrologia**, v.33, n.3, p.151-158, 2001.

RIBEIRO, H. F. L.; LÁU, H. D.; SILVA, A. O. A.; SOUSA, J. S.; VALE, W. G. Preliminary report on artificial insemination in buffaloes of the Amazon region, through imported semen. In: CONGRESSO MUNDIAL DOS CRIADORES DE BÚFALOS, 4, v.3, 1994, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos, 1994. p.591-593.

ROY, S. C.; ATREJA, S. K. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.68-84, 2008.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v.23, p.737-752, 2002.

SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **A Hora Veterinária**, ano 28, n.167, p.36-39, 2009.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v.48, p.835-850, 1996.

SINGH, B.; CHAND, D.; SINGH, P.; YADAV, N. K. Effect of vitamin C addition in the diluents on the quality of deep frozen Murrah buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen. **International Journal Animal Science**, v.11, p.131-132, 1996.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v.25, p.5-18, 2004.

SILVA, A. O. A.; MOTA, A. V.; RIBEIRO, H. F. L.; SOUZA, J. S.; REIS, N. A.; VALE, W. G. Preliminary report on ringer-lactate solution as an alternative diluter for buffalo semen. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1, 2002. **Anais...** Belém: PRODEPA - Governo do Estado do Pará, 2002. p.467-470.

SILVA, K. M. G; GAMBOA, S. C.; RODRIGUES, A. S.; SANTOS, J. R.; GUERRA, M. M. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelamento de sêmen de garanhões férteis e subférteis. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p. 2271-2277, 2008.

SINHA, M. P.; SINHA, A. K.; SINGH, B. K.; PRASAD, R. L. The effect of glutadione on the motility enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**, v.41, p.237-243, 1996.

TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, p.189-198, 2001.

TURNER, R. M. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? **Journal of Andrology**, v.24, p.790-802, 2003.

TWIGG, J.; IRVINE, D. S.; HOUSTON, P.; FULTON, N.; MICHEL, L.; AITKEN, R.J. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. **Molecular Human Reproduction**, v.4, p.439-445, 1998.

UPRETI, G. C.; JENSEN, K.; OLIVER, J. F.; DUGANZICH, R.; MUNDAY, R.; SMITH, J. F. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.269-278, 1997.

VALCÁRCEL, A.; HERAS, M. A.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Comparison between Sephadex G-10 and percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.41, p.215-224, 1996.

VALE, W. G.; RIBEIRO, H. F. L.; SOUSA, J. S.; OHASHI, O. M. Inseminação artificial em búfalos (*Bubalus bubalis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 21, 1984. **Anais...** Belém: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1984. p.91.

VALE, W. G. Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1, 2002. **Anais...** Belém: PRODEPA - Governo do Estado do Pará, 2002. p.156-171.

YOVICH, J. M.; EDIRISHINGHE, W. R.; CUMMINS, J. M.; YOVICH, J. L. Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer (PROST) program for severe male factor infertility. **Fertility and Sterility**, v.50, p.179-181, 1988.

WANG, A. W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v.49, p.921-925, 1997.

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



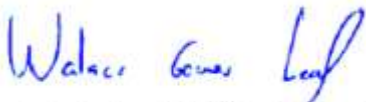
WATSON, P. F. The causes of reduced fertility of cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.61, p.481-492, 2000.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.639-658, 1993.

ZICARELLI, L. Management in different environmental conditions. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, v.1, 1994, Sao Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 1994, p.15-39.

ZINI, A.; KAMAL, K.; PHANG, D. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. **Urology**, v.58, p.258-261, 2001.

ANEXO A

	comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação	
<p>PARECER BIO011-10</p> <p>Projeto: Uso de substâncias anti-oxidantes no sêmen congelado bubalino para aumento da qualidade e fertilidade a campo</p> <p>Coordenador: Dr. Alexandre Rosseto Garcia</p> <p>Área Temática: Biologia</p> <p>Vigência: 04/2008 a 04/2011</p> <p>Nº no CEPAE-UFPA: BIO011-10</p> <p>O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 1568/2005 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve APROVAR a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.</p> <p style="text-align: right;">Belém, 03 de março de 2008</p> <p style="text-align: center;"> Presidente do Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará</p>		

Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE/Universidade Federal do Pará) quanto ao protocolo experimental usado.