

MEDICINA VETERINÁRIA

EFEITO DA ADIÇÃO DE TROLOX E GLUTATIONA REDUZIDA
NA VIABILIDADE *in vitro* DE ESPERMATOZOIDES DE CÃES

PAULO CÉSAR VASCO DE ALBUQUERQUE PEIXOTO¹, ZORAIDE FERNANDES COLETO², CRISTIANE SCAVUZZI MOURA³, FELIPE COSTA ALMEIDA³, PIERRE CASTRO SOARES⁴, SILDIVANE VALCÁCIA SILVA⁵
E MARIA MADALENA PESSOA GUERRA⁴

¹Médico Veterinário Autônomo, Mestre, Maceió, AL, Brasil

²Médica Veterinária Autônoma, Doutora, Ji-Paraná, RO, Brasil

³Médico Veterinário Autônomo, Mestre, Aracaju, SE, Brasil

⁴Professores Doutores da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁵Professora Doutora da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil - sildivane@yahoo.com.br

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o efeito da adição dos antioxidantes Trolox e Glutathione reduzida (GSH) na viabilidade *in vitro* de espermatozoides criopreservados de cães, amostras de sêmen foram colhidas de animais das raças Buldogue Francês (n=1), Basset Hound (n=2) e Rottweiler (n=1), por meio de manipulação digital. A seguir, procedeu-se à avaliação macroscópica e microscópica e divisão do volume de sêmen em alíquotas, de acordo com os experimentos e grupos experimentais, utilizando-se diferentes concentrações de Trolox (200 e 300 µM/L) ou GSH (2 e 5 µM/L). As amostras foram envasadas em palhetas (0,25 mL), criopreservadas em

máquina de congelamento e armazenadas em nitrogênio líquido. Após descongelamento a 37 °C (60 seg) e incubação durante 60 minutos, constatou-se que os resultados de motilidade, vigor e espermatozoides com acrossomas íntegros evidenciaram diferença significativa (P<0,05) apenas entre os tempos de incubação, nos três experimentos. No Exp. 2, a adição de 2 e 5 µM/L de GSH (G2 e G3) determinou maior (P<0,05) percentual de células sem estresse oxidativo. Concluiu-se que GSH, nas concentrações de 2 e 5 µM/L, pode ser adicionada ao diluente de criopreservação do sêmen de cães.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidante; cães; criopreservação; sêmen; viabilidade.

EFFECT OF TROLOX AND GLUTATHIONE REDUCED (GSH) ADDITION ON THE *in vitro* VIABILITY OF DOG CRYOPRESERVED SPERM

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of adding Trolox and Glutathione reduced antioxidants on the *in vitro* viability of dog cryopreserved sperm, semen samples were harvested from animals of French Bulldog (n=1), Basset Hound (n=2) and Rottweiler (n=1) breeds, through digital manipulation. After macroscopic and microscopic evaluation, the volume of semen was divided in aliquots, according to the experiments and experimental groups,

using different concentrations of Trolox (200 and 300 µM/L) or GSH (2 and 5 µM/L). The samples were packaged in straws (0.25 mL), cryopreserved in freezing machine and stored in liquid nitrogen. After thawing at 37°C (60 sec) and incubation during 60 minutes, we verified that motility, vigor and sperm with intact acrosomes showed significant difference (P<0.05) only among incubation times, on the three experiments. In Exp.

2, the addition of 2 and 5 $\mu\text{M/L}$ of GSH (G2 and G3) determined higher ($P<0.05$) percentage of sperm without oxidative stress. Therefore, we could conclude that GSH,

on the concentration of 2 and 5 $\mu\text{M/L}$, can be added to diluent of dog semen cryopreservation.

KEYWORDS: Antioxidant; cryopreservation; dog; semen; viability.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen possibilita melhor aproveitamento dos ejaculados de um reprodutor, assim como a difusão de material genético (SILVA et al., 2001). No entanto, esse procedimento reduz a fertilidade dos espermatozoides devido a lesões estruturais e funcionais advindas de estresse térmico (MORTON & BRUCE, 1989; JASKO, 1994), osmótico e oxidativo (WATSON, 2000; BALL & VO, 2001), decorrentes da redução de temperatura, armazenamento, descongelamento (MEDEIROS et al., 2002) e toxicidade dos crioprotetores (WATSON, 2000; BALL & VO, 2001).

Ressalta-se, todavia, que os efeitos da criopreservação na fisiologia espermática são semelhantes àqueles observados após o processo de capacitação (WATSON, 2000), determinando aumento da permeabilidade da membrana e da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), resultando em danos peroxidativos, uma das principais causas da redução da viabilidade e da fertilidade dos espermatozoides (HSU et al., 1998). Em todos os organismos aeróbicos, as ROS são formadas e degradadas em concentrações fisiológicas normais para a realização das funções celulares, mas, em quantidades excessivas, determinam estresse oxidativo. O aumento da produção intracelular de ROS ameaça a integridade das diversas biomoléculas, incluindo proteínas (STADTMAN & LEVINE, 2000), lipídios (YLÄ-HERTTUALA, 1999) e DNA (MATÉS et al., 1999; MARNETT, 2000).

O uso de antioxidantes para neutralizar os efeitos da ação das ROS pode melhorar a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides criopreservados. Dessa forma, a adição dessas substâncias aos meios diluidores de congelamento tem sido testada com a finalidade de reduzir os danos celulares provocados pelo estresse oxidativo (MICHAEL et al., 2007). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a glutatona reduzida (GSH) é o principal constituinte do sistema antioxidante de defesa e ela está envolvida no mecanismo de proteção celular, por meio da remoção de ROS, incluindo os peróxidos formados no metabolismo

do oxigênio. Esse efeito deve-se ao fato de a GSH apresentar uma potente capacidade de doar elétrons (DRÖGE et al., 1994). A vitamina E, por sua vez, atua como captador de ROS e reparador de membranas (HERRERA & BARBAS, 2001), interferindo na peroxidação lipídica catalisada *in vitro* pelo íon ferroso e, conseqüentemente, preservando a capacidade de fusão dos espermatozoides aos ovócitos (AITKEN & CLARKSON, 1988).

No sêmen de canídeos, a criopreservação é uma técnica muito estudada; no entanto, existem ainda algumas pesquisas a ser realizadas para a padronização dessa metodologia, devido principalmente às particularidades inerentes a esta espécie. Dessa forma, diferentes meios diluidores têm sido testados visando obter aquele que melhor preserve a viabilidade pós-descongelamento dos espermatozoides de cães (CHRISTIANSEN, 1986). Por conseguinte, considerando-se os danos espermáticos causados pelo processo de congelamento, como consequência do aumento da produção de ROS e da permeabilidade de membrana, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da adição dos antioxidantes Trolox e Glutatona reduzida na viabilidade *in vitro* de espermatozoides criopreservados de cães.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados quatro cães adultos, com idade variando de 2 a 5 anos e fertilidade comprovada, pertencentes ao canil Brave Basset localizado no Município de Camaragibe (PE). Os experimentos foram realizados durante os anos de 2006 e 2007. Nos experimentos 1 e 3, utilizaram-se animais das raças Buldogue Francês ($n=1$), Basset Hound ($n=2$) e Rottweiler ($n=1$), enquanto no experimento 2 foram utilizados animais das raças Buldogue Francês ($n=1$) e Basset Hound ($n=2$). Todos os animais foram submetidos às mesmas condições de manejo sanitário e alimentados com ração comercial uma vez ao dia, de acordo com o peso corporal (10g/Kg de PV), além de ser fornecida água *ad libitum*.

Em cada experimento, foram colhidos quatro ejaculados/animal por meio da técnica da

manipulação digital (CHRISTIANSEN, 1986), totalizando 44 amostras de sêmen, as quais foram acondicionadas em tubos de ensaio e mantidas em banho-maria (37°C) durante o procedimento de avaliação macroscópica (volume, cor e aspecto) e microscópica (motilidade progressiva, vigor, concentração, integridade de acrossoma e de DNA e estresse oxidativo).

Os parâmetros macroscópicos foram aferidos diretamente nos tubos de ensaio. Para análise da motilidade progressiva (0-100%) e do vigor espermático (0-5) de cada ejaculado, foi depositada uma alíquota (10 µL) de sêmen sobre lâmina previamente aquecida a 37°C e conduzida ao microscópio óptico (Quimis®, Diadema, São Paulo), sendo aprovadas as amostras que apresentaram motilidade progressiva $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 (CBRA, 1996). A concentração espermática foi obtida em Câmara de Neubauer de acordo com a técnica descrita por MIES FILHO (1987) e o resultado expresso em milhões de espermatozoides/mL de sêmen.

A avaliação da integridade do acrossoma foi realizada por meio da técnica de coloração FITC-conjugada ao *Peanut* aglutinina (FITC-PNA; MOURA et al., 2013). Inicialmente, alíquotas de 10 µL de sêmen foram utilizadas na preparação de esfregaços e armazenadas (4°C) protegidas da luz até o momento da avaliação. No prazo máximo de até duas semanas, as lâminas foram coradas com FITC-PNA (Sigma, Saint Louis, MO, USA), acondicionadas em caixa de isopor durante 20 minutos a 4°C e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Tóquio, Japão), utilizando-se o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm), em que foram contados 200 espermatozoides/lâmina e classificados em: a) acrossomas intactos (AI), quando apresentava a região acrossomal corada em verde; b) acrossomas reagidos (AR), quando apresentavam a região acrossomal com coloração verde mesclada; sem coloração ou apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática.

A integridade de DNA foi avaliada por meio da técnica de Laranja de Acridina (EVENSON et al., 1999), na qual uma alíquota (10 µL) de sêmen foi diluída em 990 µL de solução TNE (Tris.HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA.Na₂.2H₂O a 1mM, q.s.p. 100 mL; pH 7,4), em tubos de microcentrifuga (1 milhão de células/mL), criopreservadas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico (-196°C). No momento da análise, as amostras foram descongeladas a 37°C e, a seguir,

adicionaram-se 200 µL de solução TNE em tubos de microcentrifuga imersos em gelo. Logo depois, foram adicionados 400 µL de solução detergente (0,1 mL de Triton X-100, 0,877 g de NaCl, 8,0 mL de HCl 1N; pH 1,4). Após 30 segundos, adicionaram-se 600 µL da solução de Laranja de Acridina (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) tamponada (ácido cítrico 0,1M, fosfato de sódio 0,2 M, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM; pH 6,0). Em seguida, alíquotas (5 µL) dessa solução foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Tokio, Japão), utilizando-se o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm). Um total de 200 espermatozoides/lâmina foi avaliado e classificado como: a) espermatozoides com fluorescência vermelha apresentavam estruturas de cromatina anormal, e b) espermatozoides com fluorescência verde apresentavam estruturas de cromatina normal.

Utilizou-se a análise da ocorrência de estresse oxidativo por meio da técnica descrita por SALEH & AGARWAL (2002). Alíquotas (10 µL) de sêmen foram submetidas ao teste de Nitroblue Tetrazolium (NBT), em que, inicialmente, as amostras foram diluídas (1:1; v:v) em solução de 10% de NBT (Sigma, Saint Louis, MO, USA) e incubadas durante 30 minutos à temperatura de 37 °C. A seguir, as amostras acondicionadas em tubos de ensaio permaneceram durante 30 minutos em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 250g (durante 5 minutos). Em seguida, foram preparados esfregaços do *pellet* das amostras, os quais foram submetidos à secagem em temperatura ambiente. Após secagem, foram contados 100 espermatozoides/lâmina, em microscópio de contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão; 100X), os quais foram avaliados da seguinte forma: 1) espermatozoide com estresse oxidativo, quando apresentava depósito de formazana na cabeça ou na peça intermediária; 2) espermatozoide sem estresse oxidativo, quando nenhum depósito de formazana foi observado na célula espermática.

Após colheita e análise dos ejaculados, as amostras aprovadas foram divididas em alíquotas iguais, de acordo com o experimento. Ao diluidor Tris-gema (3,28 g de Tris-hidroximetilaminometano; 1,78g de ácido cítrico; 1,25 g de frutose; 20% de gema de ovo; 100 mL de água destilada; pH 6,8, MOURA et al., 2013), foram adicionados 6% de glicerol, além de antioxidantes de acordo com o experimento e o grupo experimental, de maneira que cada grupo foi criopreservado em

quadruplicata, seguindo a ordem aleatória de criopreservação. Segue o delineamento experimental, segundo cada experimento:

- Experimento 1: G1) sem antioxidantes (Grupo Controle); G2) 200 $\mu\text{M/L}$ de Trolox (Sigma, Saint Louis, MO, USA); e G3) 300 $\mu\text{M/L}$ de Trolox.
- Experimento 2: G1) sem antioxidantes (Grupo controle); G2) 2 $\mu\text{M/L}$ de GSH (Sigma, Saint Louis, MO, USA); e G3) 5 $\mu\text{M/L}$ de GSH.
- Experimento 3: utilizaram-se as melhores concentrações de Trolox e GSH obtidas nos Exp. 1 e 2, correspondendo a: G1) sem antioxidantes (Grupo Controle); G2) 200 μM de Trolox (Sigma, Saint Louis, MO, USA); G3) 2 μM de GSH (Sigma, Saint Louis, MO, USA); e G4) 200 μM de Trolox + 2 μM de GSH.

As amostras de sêmen diluídas foram envasadas em palhetas (0,25 mL) e processadas em máquina de congelamento de sêmen (modelo TK 3000; TK Tecnologia em Congelamento Ltda, Uberaba, MG, Brasil), utilizando-se a curva de -0,5°C/minuto, de 25°C a 5°C, e de -12,5°C/minuto, de 5°C a -120°C. A seguir, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico (-196 °C).

Uma semana após o procedimento de criopreservação, as amostras foram descongeladas à temperatura de 37°C durante 60 segundos e avaliadas quanto à motilidade progressiva, vigor, integridade do acrossoma (Experimentos 1, 2 e 3), integridade do DNA (Experimentos 1 e 2) e ocorrência de estresse oxidativo (Experimento 2), conforme as técnicas descritas anteriormente.

Com o intuito de estudar o efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade dos espermatozoides criopreservados de cães, em diluidor à base de Tris-gema suplementado com antioxidantes (Trolox ou glutatona reduzida), as amostras descongeladas foram avaliadas pelo teste de Termo-resistência (TTR), em que se observou a motilidade progressiva e o vigor espermático após 0, 30 e 60 min de incubação a 37°C.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa PROC GLM do Statistical Analysis System (SAS). Na presença de efeito em relação aos fatores de variação, a comparação entre as médias foi realizada pela técnica da diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de Tukey. Para o

estudo da relação entre pares de variáveis, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância de 5% foi utilizado para todos os testes.

RESULTADOS

Experimento 1

As amostras de sêmen *in natura* apresentaram coloração branca e aparência leitosa. As médias e desvio padrão dos parâmetros analisados evidenciaram 2,71 \pm 0,54 mL de volume das frações ricas em espermatozoides, 207,81 \pm 28,24 x 10⁶ espermatozoides/mL de concentração espermática, 89,69 \pm 4,40% de motilidade progressiva, 4,56 \pm 0,48 de vigor, 95,75 \pm 3,30% de espermatozoides com acrossomas intactos e 100% de células com DNA íntegros.

Após descongelamento, as células espermáticas criopreservadas em Tris-Gema, acrescido de diferentes concentrações de Trolox, não evidenciaram diferença significativa (P>0,05) na motilidade progressiva (Figuras 1a) e no vigor espermático (Figuras 1b), entre os grupos experimentais, durante o TTR. Todavia, evidenciou-se redução significativa (P<0,05) no percentual de células móveis (Figura 1a), em função do tempo de incubação, até os 45 minutos de avaliação. Em contrapartida, observou-se que o vigor das células espermáticas (Figuras 1b) apresentou diferença significativa (P<0,05) apenas dos 15 aos 45 minutos do teste TTR.

Com relação aos percentuais de espermatozoides com acrossoma íntegros, verificou-se não haver diferença entre as médias obtidas após o descongelamento (P>0,9320), sendo 22,95% para as amostras do grupo controle (G1); 24,95% para as amostras criopreservadas com 200 μM de Trolox (G2) e 23,74% para as amostras criopreservadas com 300 μM de Trolox (G3). Na avaliação da correlação de Pearson (Tabela 1), observou-se correlação significativa entre acrossoma e motilidade progressiva (P=0,0421), assim como entre motilidade progressiva e vigor espermático (P=0,0001), em todas as amostras de sêmen criopreservadas, independente da adição de Trolox ao diluente Tris-gema.

Com relação aos percentuais de espermatozoides com acrossoma íntegros, verificou-se não haver diferença entre as médias obtidas após o descongelamento (P>0,9320), sendo 22,95% para as amostras do grupo controle (G1);

24,95% para as amostras criopreservadas com 200 μM de Trolox (G2) e 23,74% para as amostras criopreservadas com 300 μM de Trolox (G3). Na avaliação da correlação de Pearson (Tabela 1), observou-se correlação significativa entre

acrossoma e motilidade progressiva ($P=0,0421$), assim como entre motilidade progressiva e vigor espermático ($P=0,0001$), em todas as amostras de sêmen criopreservadas, independente da adição de Trolox ao diluente Tris-gema.

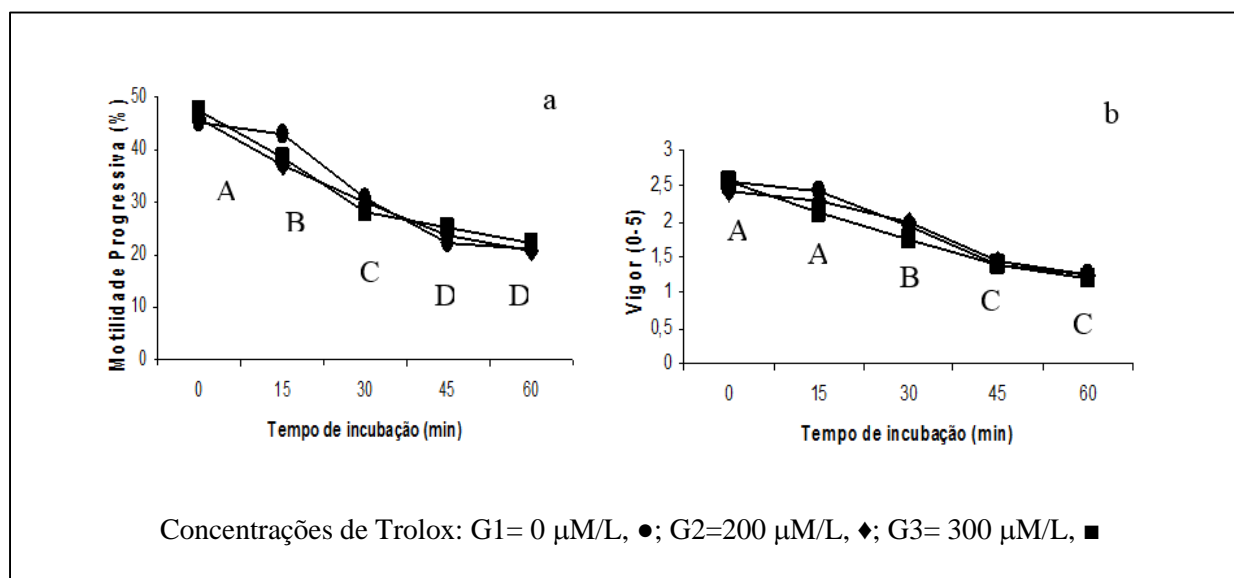


Figura 1. Motilidade progressiva (a) e vigor espermático (b) em amostras de sêmen de cães submetidas à congelamento em Tris-gema acrescido de diferentes concentrações de Trolox, durante o teste de termo-resistência a 37°C. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa ($P<0,05$) entre tempos de incubação.

Tabela 1. Matriz de correlação de Pearson (r) e respectivos níveis de significância entre pares de variáveis de amostras de sêmen de cães sem e com adição de Trolox

	Acrossoma	MP	Vigor
Acrossoma	1	-0,30 (0,0421)	-0,15 (0,3270)
MP		1	0,54 (0,0001)
Vigor			1

MP= Motilidade Progressiva.

Experimento 2

As amostras de sêmen *in natura* apresentaram-se de coloração branca e aparência leitosa. As médias e desvio padrão do volume das frações ricas em espermatozoides, da concentração espermática, da motilidade progressiva, do vigor, do percentual de células com acrossomas íntegros, de células com estresse oxidativo e de células com DNA íntegros, foi de $1,92\pm 0,36$ mL; $127,71\pm 20,93\times 10^6$ espermatozoide/mL; $93,33\pm 5,00\%$; $5,00\pm 0,00$; $69,64\pm 6,98\%$; $42,17\pm 2,94\%$ e $100,00\%$, respectivamente.

Durante o período de incubação de 60 min a 37 °C (TTR), observaram-se diferenças significantes ($P<0,05$) nos valores de motilidade progressiva

(Figura 2a) e vigor espermático (Figura 2b); entretanto, ao se avaliar o efeito da adição de antioxidantes, não foi observada diferença ($P>0,05$) entre os grupos experimentais, em cada momento de avaliação, nesses dois parâmetros estudados (Figuras 2a e 2b).

A análise da integridade do acrossoma das células espermáticas (Tabela 2) não evidenciou diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos. Em contrapartida, o percentual de espermatozoides sem estresse oxidativo (Tabela 2) diferiu ($P<0,05$) entre os grupos experimentais, revelando que as amostras de sêmen suplementadas com 2 e 5 μM de GSH (G2 e G3, respectivamente) foram superiores àquelas do

Grupo Controle (G1). Além disso, constatou-se que 100% dos espermatozoides apresentaram DNA íntegro, em todos os grupos experimentais (G1, G2 e G3).

Na avaliação da correlação de Pearson

(Tabela 3), observou-se correlação significativa apenas entre motilidade progressiva e acrossomas íntegros ($P=0,0467$), em todas as amostras de sêmen criopreservadas, independente da adição de GSH ao diluente Tris-gema.

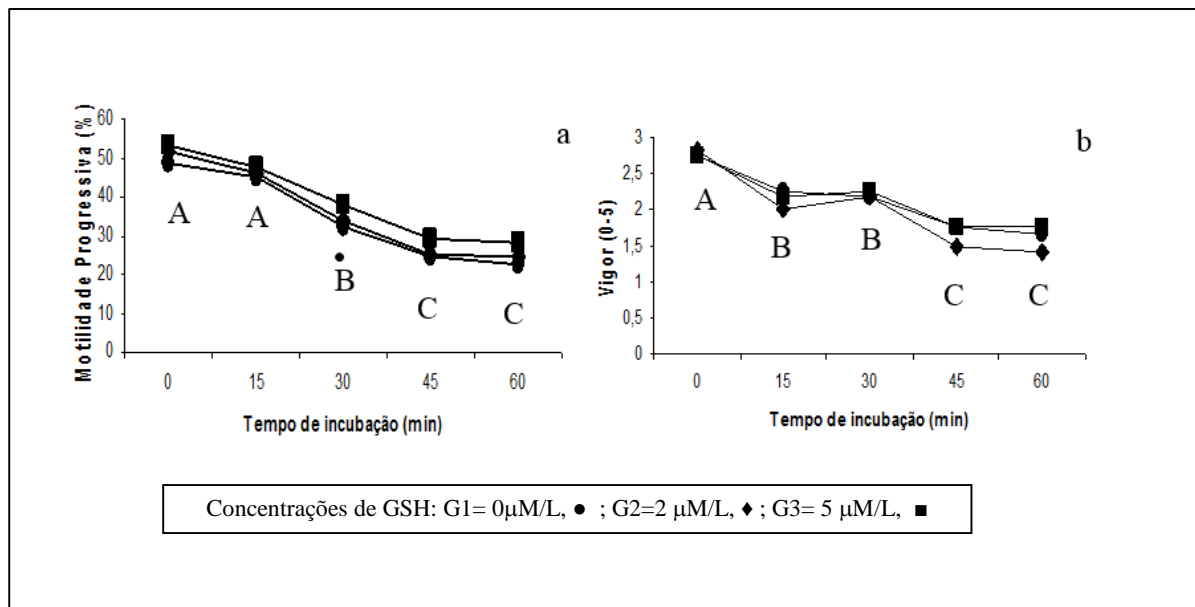


Figura 2. Motilidade progressiva (a) e vigor espermático (b) em amostras de sêmen de cães congeladas com Tris-gema acrescido de diferentes concentrações de GSH, durante o teste de termo-resistência a 37°C. Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa ($P<0,05$) entre tempos de incubação.

Tabela 2. Média e desvio padrão do percentual de espermatozoides de cães com acrossomas íntegros, sem estresse oxidativo e com DNA íntegros, após criopreservação com diluidor à base de Tris-gema suplementado com diferentes concentrações de Glutaciona Reduzida (GSH), durante o teste de termo-resistência a 37°C

Grupos	Variáveis		
	Acrossomas íntegros	Estresse Oxidativo	DNA íntegros
G1	50,63±14,81	12,87±1,22b	100,00
G2	47,66±12,87	17,16±1,47a	100,00
G3	47,22±10,31	17,73±1,65a	100,00

G1= 0 µM/L; G2=2 µM/L; G3= 5 µM/L de Glutaciona reduzida. Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença significativa ($P<0,01$) entre grupos experimentais.

Tabela 3. Matriz de correlação de Pearson (r) e respectivos níveis de significância (P) entre pares de variáveis do sêmen de cães sem e com adição de GSH

	MP	Vigor	Acrossoma	Estresse Oxidativo
MP	1	0,12 (0,5130)	-0,33 (0,0467)	0,21 (0,2219)
Vigor		1	0,05 (0,7861)	0,11 (0,5266)
Acrossoma			1	-0,03 (0,8529)
Estresse				1

MP = Motilidade Progressiva.

Experimento 3

A avaliação macroscópica das amostras de sêmen *in natura* evidenciou coloração branca e aspecto leitoso. O volume médio das frações ricas em espermatozoides foi de $2,21 \pm 0,54$ mL, com concentração espermática média de $164,06 \pm 28,25 \times 10^6$ espermatozoide/mL. A motilidade progressiva apresentou média de $89,69 \pm 4,40\%$. O vigor apresentou média de $4,56 \pm 0,48$ e o percentual médio de espermatozoides com acrossomas íntegros foi de $91,75 \pm 4,57\%$.

Os resultados da avaliação das células espermáticas criopreservadas em Tris-Gema acrescidas de Trolox, GSH ou a associação de Trolox + GSH (Figura 3), demonstraram que, durante todo o período de incubação a 37°C (0, 30 e 60 min), os valores médios de motilidade progressiva

(Figura 3a), vigor (Figura 3b) e células com acrossomas íntegros (Figura 3c), não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais (G1, G2, G3 e G4). Todavia, nestes parâmetros (motilidade progressiva, vigor e percentual de células com acrossomas íntegros), foram constatadas reduções drásticas nos valores durante todo o período de incubação a 37°C (TTR), diferindo significativamente ($P < 0,05$) entre os tempos de avaliação (0, 30 e 60 min).

A análise da correlação de Pearson (Tabela 4) evidenciou correlação significativa apenas entre motilidade progressiva e vigor espermático ($P = 0,0001$) em todas as amostras de sêmen criopreservadas, independente da adição de Trolox e/ou GSH ao diluente Tris-gema.

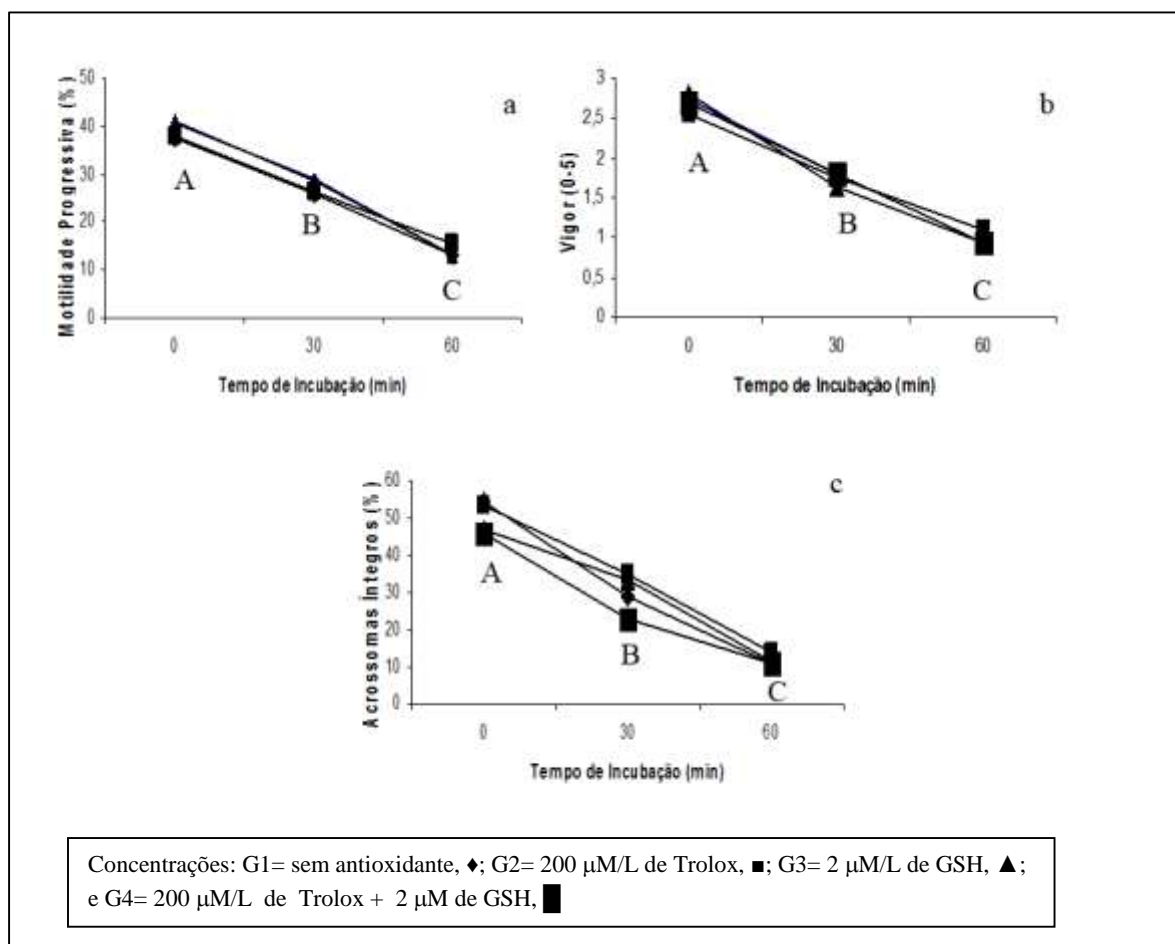


Figura 3. Motilidade progressiva (a), vigor espermático (b) e acrossomas íntegros em amostras de sêmen de cães submetidas à congelação em Tris-gema acrescido de Trolox e glutathiona reduzida, durante o teste de termo-resistência a 37°C . Letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre tempos de incubação.

Tabela 4 – Matriz de correlação de Pearson (r) e respectivos níveis de significância entre pares de variáveis do sêmen de cães sem e com adição de Trolox e/ou GSH

	MP	Vigor	Acrossoma
MP	1	0,52 (0,0001)	-0,01 (0,9671)
Vigor		1	-0,10 (0,5634)
Acrossoma			1

MP = Motilidade Progressiva.

DISCUSSÃO

Neste estudo, a adição da glutatona reduzida (GSH) e do análogo hidrossolúvel da vitamina E (Trolox), em todos os experimentos, não melhorou a motilidade progressiva e o vigor espermático, em relação ao Grupo Controle (sem adição de antioxidante), discordando dos resultados de LEITE NETTO et al. (2007), ao sugerirem que a adição de 50-60 mg de vitamina E/Kg de ração de cães da raça Boxer melhora a qualidade espermática. Os resultados obtidos neste trabalho também foram inferiores àqueles relatados por COLETO (2006), ao observarem $70,00 \pm 10,00\%$ de células móveis e $2,67 \pm 0,58$ de vigor em cães da raça Cocker Americano, utilizando diluidor Tris-gema suplementado com $200 \mu\text{M}$ de Trolox. Da mesma forma, em varrões, GROSSFELD et al. (2008) constataram que a adição de substâncias antioxidantes ao diluidor de sêmen melhora significativamente a motilidade espermática pós-descongelamento.

Vale ressaltar que, em todos os experimentos (1, 2 e 3) obteve-se, até 15 min de incubação a 37°C , a motilidade progressiva mínima de 30%, recomendada pelo CBRA (1996) para o sêmen canino. No entanto, observou-se redução da motilidade progressiva durante o TTR, corroborando com os relatos de BREININGER et al. (2005), durante incubação a 37°C de amostras de sêmen descongeladas de reprodutores suínos, alcançando valores próximos a zero após 4 horas de avaliação, em todos os tratamentos (200, 500 e $1000 \mu\text{g/mL}$ de α -tocopherol). Ressalta-se, todavia, que nas duas primeiras horas de incubação, esses autores constataram aumento ($P < 0,05$) no percentual de células móveis nos grupos tratados, em relação ao Grupo Controle (sem adição de antioxidante), diferindo dos resultados obtidos neste estudo.

MICHAEL et al. (2007) testaram a adição de vitamina E na concentração de 0,3 mM ao diluidor e obtiveram médias de $44,50 \pm 3,52$ de células móveis, não diferindo do Grupo Controle ($39,0 \pm 2,90$),

evidenciando que, apesar do α -tocopherol ser um dos mais potentes antioxidantes, seus benefícios na qualidade do sêmen descongelado são limitados. Esses resultados corroboram com os observados neste estudo, em que as concentrações de 200 (G2) e $300 \mu\text{M/L}$ (G3) de Trolox (Exp. 1) não preservaram a motilidade espermática, ao evitar o desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante (COLETO, 2006).

Da mesma forma, o vigor espermático não apresentou melhora significativa ao se suplementar as amostras de sêmen com Trolox (200 e $300 \mu\text{M/L}$) e GSH (2 e $5 \mu\text{M/L}$), quando comparadas às do Grupo Controle, nos três experimentos. Ao se avaliar o vigor espermático, de acordo com o período de avaliação pós-descongelamento, constatou-se que os valores observados imediatamente após a descongelamento encontravam-se compatíveis com sua utilização em IA de cadelas ($> 2,5$); no entanto, foram inferiores aos 3,85 pontos obtidos por MOURA et al. (2002), que utilizaram amostras de 9 cães congeladas com Tris-gema sem adição de antioxidantes. Em contrapartida, COLETO (2006) encontrou média de vigor espermático para as amostras de sêmen de cão, criopreservadas sem antioxidantes (Grupo Controle), igual a 3,33 pontos, valor também superior àqueles observados no Experimento 1 após adição de $200 \mu\text{M}$ de Trolox (2,67 pontos). Acredita-se que os resultados inferiores obtidos neste estudo, quando comparados aos relatados por outros autores, podem ser atribuídos à variação individual, raça e manejo reprodutivo dos cães utilizados. Ressalta-se, ainda, que durante a realização do TTR (37°C) constatou-se redução drástica desses valores até o término do período de incubação (60 min), sem haver interferência da adição dos antioxidantes utilizados.

Os principais locais de produção de ROS nos espermatozoides são as mitocôndrias, por meio da liberação de elétrons após a ocorrência de danos causados pela congelamento/descongelamento (BROUWERS & GADELLA, 2003), e a membrana plasmática, dependente do sistema NADPH oxidase

(AGARWAL et al., 2005). Assim, neste estudo, esperava-se que, à medida que os espermatozoides retomassem seu metabolismo normal, a adição de GSH melhorasse a sua atividade metabólica (SINHA et al., 1996), aumentando o vigor espermático.

Além disso, esperava-se maior porcentual de células com acrossomas íntegros ao se adicionarem antioxidantes nas amostras de sêmen submetidas à criopreservação (MIESTER & ANDERSON, 1983), contrapondo os efeitos negativos da elevada produção de ROS ocorrida durante o processo de congelação (AGARWAL et al., 2003). Contudo, os resultados obtidos nos Experimentos 2 e 3, no momento 0, mesmo sem evidenciarem diferença significativa entre os grupos experimentais, foram superiores aos relatos por COLETO (2006), que, ao congelar sêmen de três cães da raça Cocker Americano, utilizando diluidor à base de Tris-gema suplementado com antioxidante (Trolox e Vitamina C), obteve 39,33% e 38,67% de células com acrossomas intactos, respectivamente. Assim, constatou-se que, o acrossoma é a região mais susceptível a danos causados por choque térmico (WATSON, 1995; HOLT, 2000), devido ao alto teor de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas suas membranas (POULOS et al., 1973). Diferentemente do que foi constatado pelos relatos anteriores, os espermatozoides deste estudo apresentaram poucos danos na membrana acrossomal, independente da adição de antioxidantes; no entanto, os resultados dos Experimentos 2 e 3 são semelhantes aos de OLIVEIRA et al. (2006), em que foram obtidas médias de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras de $49,7 \pm 4,7\%$, $67,6 \pm 4,1\%$ e $56,7 \pm 7,5\%$, respectivamente, testando três diluidores (Tris5%EG, Lac5%EG e Lac5%DF), e aos dados de BUENO et al. (2001), que obtiveram $67,7 \pm 7,4\%$ e $64,1 \pm 6,4\%$ de células com acrossomas íntegros, testando dois protocolos de refrigeração (caixa de isopor e *biocool*).

Levando-se em consideração o tempo de incubação, esperava-se que a adição de Trolox e GSH, nas concentrações utilizadas, preservasse as membranas acrossomais dos espermatozoides de cães, uma vez que, durante o processo de maturação, os espermatozoides perdem a maior parte de seu citoplasma, limitando a defesa contra o estresse oxidativo e tornando-se dependentes dos antioxidantes presentes no plasma seminal (BAUMBER et al., 2005), evidenciando a importância da utilização de substâncias antioxidantes ao meio diluidor. Os resultados obtidos neste estudo divergem daqueles relatados por PEIXOTO et al. (2007), ao evidenciarem que a adição de vitamina C (600 $\mu\text{M/L}$) e Trolox (60 $\mu\text{M/L}$)

proporcionou maior proteção às membranas acrossomais de espermatozoides ovinos, bem como dos resultados de BECONI et al. (1993), que obtiveram maior porcentual de espermatozoides com acrossomas e mitocôndrias intactas ao adicionarem as vitaminas C (5 mM de ascorbato) e E (1,0 mg/mL acetato de α -tocoferol) ao diluidor de sêmen bovino.

O maior porcentual de células espermáticas sem estresse oxidativo observado nas amostras suplementadas com GSH (Experimento 2), quando comparadas às do Grupo Controle, provavelmente pode ser explicado pelo fato de este substrato ser responsável por suplementar o sistema enzimático antioxidante na inativação das ROS geradas (SOARES & GUERRA, 2009), resultando em menor grau de estresse oxidativo na célula espermática (ALVAREZ & STOREY, 1989). Esses resultados corroboram os relatos de PEIXOTO et al. (2008), ao revelarem maior porcentual de células espermáticas sem estresse oxidativo nas amostras suplementadas com Trolox e vitamina C.

Apesar de a concentração de GSH não ter sido dosada neste estudo, acredita-se que tenha havido redução nas concentrações desse antioxidante nos espermatozoides criopreservados, conforme relatado em touros (BILODEAU et al., 2000), homens (MOLLÁ et al., 2004) e varrões (GADEA et al., 2004). Evidências sugerem que o estresse oxidativo (JELEZARSKY et al., 2008) ou a ruptura das membranas celulares são as principais causas de redução das características funcionais dos espermatozoides, pós-descongelação, e que o GSH protege as membranas dos espermatozoides por meio da inibição da peroxidação lipídica (ROVER JUNIOR et al., 2001) e dos danos ocorridos durante a descongelação (SOARES & GUERRA, 2009). GADEA et al. (2004) observaram aumento da capacidade fecundante, pós-descongelação, dos espermatozoides suínos criopreservados com diluente suplementado com 5 mM de GSH, embora não tenham observado diferença nos parâmetros normais do sêmen. Esses relatos corroboram os resultados de espermatozoides com acrossomas e DNA íntegros obtidos neste estudo, apesar de terem sido constatados menores percentuais de células com estresse oxidativo nas amostras suplementadas com 2 e 5 μM de GSH.

A sobrevivência dos espermatozoides após congelação e descongelação parece depender das propriedades básicas da membrana plasmática, como composição bioquímica, resistência física, comportamento térmico e osmótico (SILVA & GUERRA, 2011). Isso pode explicar as diferenças encontradas nas amostras de sêmen dos cães deste estudo, além do fato de a associação dos dois

antioxidantes, um protetor de membrana (Trolox) e o outro removedor de ROS (GSH), não terem determinado efeitos positivos nos parâmetros espermáticos observados *in vitro*, quando comparados a outros estudos.

Por conseguinte, com base nos resultados de estresse oxidativo, concluiu-se que a glutatona reduzida, nas concentrações de 2 e 5 µM/L, pode ser adicionada ao diluente de criopreservação do sêmen de cães; entretanto, outras pesquisas devem ser realizadas visando estudar, *in vivo*, o efeito da adição deste antioxidante na preservação da capacidade fertilizante desses gametas.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do mestrado; ao Canil Brave Basset, na pessoa de Tatiana Pagliane, por ter permitido a utilização dos cães, das instalações e por ter auxiliado na realização do estudo; ao Prof. Dr. Pierre Castro Soares/UFRPE, pela colaboração com as avaliações estatísticas, e ao Prof. Dr. Lêucio Câmara Alves/UFRPE, pela colaboração e amizade.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A.; SAID, T.M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of Andrology**, v.26, p.654–60, 2005.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A. BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.4, p.829-843, 2003.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of Andrology**, v.9, p.367–376, 1988.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protectin mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Research**, v.23, p.77–90, 1989.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061-1069, 2001.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, p.772–779, 2005.
- BECONI, M.T.; FRANCA, C.R.; MORA, N.G.; AFFRANCHINO, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v.40, p.841, 1993.
- BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.282–288, 2000.
- BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; O'FLAHERTY, C.M.; BECONI, M.T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v.63, p.2126–2135, 2005.
- BROUWERS, J.F.H.; GADELLA, B.M. *In situ* detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.35, p.1382–1391, 2003.
- BUENO, R.; COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. VALENTIM, F.M. Qualidade espermática do sêmen criopreservado de cães. I – efeito do meio diluidor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 364-371, 2001.
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 1996. 65p. (Elaborado conforme convênio CBRA/MA n. 017/1996). Acesso em: <<http://pt.scribd.com/doc/151892128/Manual-para-Exame-Andrologico-e-Avaliacao-de-Semen-Animal>>.
- CHRISTIANSEN, I.J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1986. 363p.
- COLETO, Z.F. **Congelamento de sêmen da espécie canina adicionando antioxidantes**. 2006. 103p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco. Disponível em http://www.tede.ufrpe.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=796, acesso em outubro de 2013.
- De LEEUW, F.E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, v.1, p.95-104, 1991.
- DRÖGE, W.; MIHM, S.; BOCKSTETTE, M.; ROTH, S. Effect of reactive oxygen intermediates and antioxidants on proliferation and function of T lymphocytes. **Methods in Enzymology**, v.234, p.135–151, 1994.
- EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; DE ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O.P. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v.14, n.4, p.1039-1049, 1999.
- GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A.; COY, P.; MATÁS, C.; 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.690-701, 2004.
- GROSSFELD, R.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; FRENZEL, A.; MAXWELL, W.M.; RATH, D. New

- aspects of boar semen freezing strategies. **Theriogenology**, v.70, n.8, p.1225-33, 2008.
- HERRERA, E.; BARBAS, C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v.51, n.1, p.43-56, 2001.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.
- HSU, P.C.; LIU, M.Y.; HSU, C.C.; CHEN, L.Y.; GUO, Y.L. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicology**, v.128, p.169-179, 1998.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, v.10, p.156-65, 1994.
- JELEZARSKY, L.; VAISBERG, C.H.; CHAUSHEV, T.; SAPUNDJIEV, E. Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of . (GPx) in boar semen. **Theriogenology**, v.69, p.139-145, 2008.
- LEITE NETTO, L.M.C.; GÓES, P.A.A.; RODRIGUES, M.P.; CARDOSO, P.B.S.; NICHÍ, M.; BARNABE, R.C.; BARNABE, V.H. Efeito da vitamina E e do levedo de cerveja na qualidade espermática de cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba, PR. **Anais ...** Belo Horizonte, MG: CBRA, 2007. p.171. Disponível em: <<https://docs.google.com/viewer?url=http%3A%2F%2Fwww.cbra.org.br%2Fportal%2Fpublicacoes%2Fanaixviiicbra%2FANAIS%2520do%2520XVII%2520CBRA.pdf>>
- MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v.21, p.361-370, 2000.
- MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I.N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**, v.32, n.8, p.595-603, 1999.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.
- MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; SARATIS, P.; BOSCO, C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.68, p.204-212, 2007.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial nos cães**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 750p.
- MIESTER, A.; ANDERSON, L. Glutathione. **Annual review of biochemistry**, v.52, p.71-90, 1983.
- MOLLÁ, M.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A.; REMOHI, J.; BALLESTEROS, A.; GADEA, J. Freezing procedure produces a reduction in the human spermatozoa glutathione content. **Journal of Andrology**, v.25 (Suppl.), p.45, 2004.
- MORTON, D.B.; BRUCE, S.G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.39, p.311-316, 1989.
- MOURA, C.S.; CAVALCANTI, M.C.O.; GUERRA, M.M.P. et al. Teste de avaliação *in vitro* e criopreservação do sêmen de cão utilizando diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.9, p.102-106, 2002.
- MOURA, C.S.; NUNES, A.K.S.; SILVA, B.S.; PEIXOTO, C.A.; SILVA, A.R.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeito da temperatura de descongelamento na integridade de espermatozoides criopreservados de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.4, p.1057-1064, 2013.
- OLIVEIRA, E.C.S.; JULIANI, G.C.; HENRY, M.; MARQUES JR, A.P. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.1116-1122, 2006.
- PEIXOTO, A.L.V.A.; MONTEIRO Jr, P.L.J.; CÂMARA, D.R.; VALENÇA, R.M.B.; SILVA, K.M.G.; GUERRA, M.M.P. Efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com tris-gema suplementado com vitamina C e Trolox. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.11, n.1, p.16-24, 2008.
- POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.46, p.541-549, 1973.
- ROVER JUNIOR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v.23, n.6, p.737-752, 2002.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.; SILVA, L.D.M. Criopreservação do sêmen canino: Revisão. **Ciência Animal**, v.11, n.2, p.119-129, 2001.
- SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.4, p.370-384, 2011.
- SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K.; PRASAD, R.L. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Theriogenology**, v.41, p.237-243, 1996.
- SOARES, A.T.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.3, n.2, p.53-63, 2009.
- STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Protein oxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.899,

p.191–208, 2000.

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

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

YLÄ-HERTTUALA, S. Oxidized LDL and atherogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.874, p.134–137, 1999.

Protocolado em: 24 ago. 2008 Aceito em: 09 set. 2013