

EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO PÓS-DESCONGELAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES OVINOS CRIOPRESERVADOS COM TRIS-GEMA SUPLEMENTADO COM VITAMINA C E TROLOX

Ana Lydia Vasco de Albuquerque PEIXOTO^{1*}; Pedro Leopoldo Jerônimo MONTEIRO Jr²;
Diogo Ribeiro CÂMARA¹; Rômulo Menna Barreto VALENÇA¹; Karen Mascaro Gonçalves
SILVA³; Maria Madalena Pessoa GUERRA⁴

RESUMO - Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados em diluente Tris-Gema suplementado com vitamina C e Trolox. Amostras de sêmen de quatro reprodutores ovinos da raça Santa Inês foram colhidas com auxílio de vagina artificial e, após efetuadas as avaliações (motilidade, vigor), procedeu-se à formação do *pool* de amostras, o qual foi submetido ao procedimento de diluição com Tris-Gema acrescido de antioxidantes de acordo com o grupo experimental: G1) Tris-Gema (Grupo controle); G2) Tris-Gema + 600µM/L de vitamina C; G3) Tris-Gema + 60µM/L de Trolox e G4) Tris-Gema + 600µM/L de vitamina C + 60µM/L de Trolox. A seguir, as palhetas (0,25 mL) contendo 100 x 10⁶ espermatozoides foram colocadas em máquina de congelamento utilizando a curva rápida (- 0,5 °C/ min, de 25 °C a 5 °C, e a - 12,5 °C/ min, de 5 °C a -120 °C) e, após atingir - 20 °C, as palhetas foram imersas e armazenadas em nitrogênio líquido. Após descongelamento a 37 °C durante 30 segundos, as amostras de sêmen foram transferidas para tubos de ensaio previamente aquecidos (37 °C) e mantidas nesta temperatura, onde foram analisadas a 0, 30 e 60 min de incubação quanto a motilidade progressiva (MP), vigor, integridade de acrossoma (IA) e de DNA, e estresse oxidativo (EOX). Constataram-se diferenças significativas (P<0,05) entre os tempos de incubação (0, 30 e 60 min) para MP, IA e EOX, assim como entre os grupos experimentais para os parâmetros de IA e EOX. Todavia, o G2 (vitamina C) apresentou menor percentual de espermatozoides com EOX (P<0,05). Conclui-se que a adição de vitamina C (600µM/L) pode ser utilizada para minimizar os efeitos negativos da criopreservação em espermatozoides de ovinos.

Termos para indexação: Integridade, acrossoma, DNA, estresse oxidativo, antioxidantes.

INCUBATION TIME EFFECT AFTER THAWING ON THE VIABILITY OF CRYOPRESERVED OVINE SPERM WITH TRIS-YOLK SUPPLEMENTED WITH VITAMIN C AND TROLOX

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the effect of the incubation time after thawing on the viability of ovine sperm cryopreserved in Tris-yolk diluent supplemented with vitamin C and Trolox. Semen samples of four Santa Ines rams

¹ Médico(a) Veterinário(a), Prof./CESMAC. Rodovia Divaldo Suruagy, S/N, Quadra 4, Lote 4 - Marechal Deodoro/AL. CEP: 57.000-000 E-mail:analydiavet@hotmail.com. ***Autora para correspondência.**

² Estudante de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

³ Médica Veterinária, Dra.

⁴ Médica Veterinária, Profa. Associado da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária.

were collected with an artificial vagina and evaluated according to motility and vigor. The semen samples' pool was submitted to dilution with Tris-yolk supplemented with antioxidant substances in accordance with the experimental group: G1) Tris-yolk (Control Group); G2) Tris-yolk + 600 μ M/L of vitamin C; G3) Tris-yolk + 60 μ M/L of Trolox and G4) Tris-yolk + 600 μ M/L of vitamin C + 60 μ M/L of Trolox. After this, the straws (0.25 mL) with 100×10^6 spermatozoa were transferred to a freezing machine using the fast curve (- 0.5 °C/minute, from 25 °C to 5 °C, and - 12.5 °C/minute, from 5 °C to -120 °C) and after to reaching -120 °C the straws were immersed and stored in liquid nitrogen (-196 °C). After thawing at 37 °C during 30 seconds, the semen samples were transferred to dry test tubes previously warmed (37 °C) and kept at this temperature, where they were analyzed at 0, 30 and 60 minutes of incubation according to progressive motility (PM), vigor, acrosome and DNA integrity (AI) and oxidative stress (SOX). Significant differences were evidenced ($P < 0.05$) between incubation time to PM, AI and SOX, as well as between experimental groups to AI and SOX parameters. However, the G2 (vitamin C) had lower percentage of sperms with oxidative stress ($P < 0.05$). It can be concluded that vitamin C (600 μ M/L) addition can be used to minimize the negative effects of cryopreservation of ram sperm.

Index terms: Integrity, acrosome, DNA, oxidative stress, antioxidants.

INTRODUÇÃO

Os processos de refrigeração, congelação e descongelamento causam danos à membrana, acrossoma, motilidade progressiva e metabolismo espermático para produção de energia, prejudicando o tempo de sobrevivência e a capacidade fecundante dos espermatozoides no sistema reprodutor feminino (WATSON, 2000). A avaliação da longevidade dos espermatozoides, através de repetidas observações de motilidade pós-descongelamento em tempos variados, conhecida como teste de termorresistência (TTR) espermática (PEÑA et al., 2003), associada às avaliações de sua integridade morfológica (MAXWELL e WATSON, 1996), podem ser considerados bons indicadores da funcionalidade da célula espermática (PEÑA et al., 2003).

Os espermatozoides são vulneráveis aos efeitos tóxicos do estresse oxidativo ocorridos durante a congelação/descongelamento (BROUWERS et al., 2005) em virtude de elevadas concentrações de espécies reativas ao oxigênio (ROS) prejudicarem a motilidade, a viabilidade e a função espermática através da interação com lipídeos da membrana, proteínas, DNA mitocondrial e nuclear (SILVA et al., 2007). No entanto,

procedimentos laboratoriais como diluição (MAXWELL e WATSON, 1996), centrifugação (HOLT, 2000), refrigeração e congelação (KUMAR et al., 2003) determinam aumento na produção de ROS espermático. Substâncias antioxidantes têm sido utilizadas para prevenir a produção ou os efeitos deletérios do estresse oxidativo causado pela excessiva quantidade de oxidantes. Todavia, a ação dos antioxidantes depende do tipo e da concentração das ROS produzidas (AGARWAL et al., 2004), além do tempo de incubação da célula espermática pós-descongelamento (WATSON, 2000).

O ácido ascórbico atua como inibidor de uma grande variedade de ROS e possui habilidade de contrapor ao efeito do H_2O_2 nos danos causados ao DNA espermático (DONNELLY et al., 1999). O α -tocoferol e seu análogo hidrossolúvel, o Trolox, inibem as reações oxidativas e neutralizam os efeitos deletérios dos radicais peróxilas (SILVA et al., 2007). Tem sido relatado também que o ácido ascórbico e o α -tocoferol agem sinergicamente para evitar a peroxidação lipídica da célula através da redução da produção de ROS induzida pelo H_2O_2 (DONNELLY et al., 1999).

Uma vez que o tempo de sobrevivência e a viabilidade espermática pós-descon-

gelação ainda são desafios para a indústria da produção de sêmen congelado, e que a adição de antioxidantes pode prevenir os danos espermáticos, neste estudo objetivou-se avaliar o efeito do tempo de incubação pós-descongelação sobre a viabilidade de espermatozóides ovinos criopreservados em diluente Tris-Gema suplementado com vitamina C e Trolox.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro reprodutores da raça Santa Inês, com idade entre 3 e 5 anos, criados em sistema extensivo, no município de Rio Largo-AL, alimentados em pasto formado por capim Tifton e *Bracharia* sp., além de serem fornecidos sal mineral e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a exame andrológico constituído de avaliação clínica geral e do sistema reprodutor, sendo selecionados apenas os animais considerados aptos à reprodução.

Quatro ejaculados/macho foram colhidos semanalmente (n=16) usando vagina artificial, com auxílio de uma fêmea manequim. Em seguida, o sêmen foi mantido em banho-maria (37 °C) durante avaliação macroscópica e microscópica. As células espermáticas foram avaliadas, antes e após a congelação, quanto à motilidade progressiva (MP), vigor, integridade de acrossoma, integridade do DNA e estresse oxidativo.

Para análise da motilidade progressiva e do vigor espermático, uma alíquota de 10 µL de sêmen foi depositada sobre lâmina previamente aquecida a 37 °C e conduzida ao microscópio óptico (Optech, Alemanha), onde se avaliou MP (0-100 %) e vigor espermático (0-5). Em seguida, realizou-se o *pool* dos ejaculados dos quatro reprodutores e procedeu-se à avaliação de motilidade, vigor e concentração espermática, sendo submetidas à congelação as amostras que apresentaram MP $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 (CBRA, 1996).

A análise de integridade do acrossoma foi realizada diluindo-se 10 µL de sêmen em 990 µL de solução Tris (3,605 g Tris; 2,024 g Ácido Cítrico; 1,488 g Frutose; q.s.p. 100

mL; pH 6,8), na concentração de 1 a 2 milhões de células/mL. A seguir, procedeu-se a confecção das lâminas, as quais foram armazenadas (4 °C) e protegidas da luz. No prazo de 2 semanas, as lâminas foram coradas com FITC - conjugada ao Peanut aglutinina (FITC-PNA) (ROTH et al., 1998) e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Japão) utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm). Foram contados 200 espermatozóides/lâmina e classificados em: a) acrossomas intactos (AI), quando se apresentavam corados em verde; b) acrossomas reagidos (AR), quando apresentavam coloração verde mesclada; sem coloração ou apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática.

Utilizou-se a técnica de Laranja de Acridina (EVENSON et al., 1999) para avaliação da integridade de DNA, onde alíquota de 10 µL de sêmen foi diluída em 990 µL de solução de TNE (0,15M NaCl; 0,01 M TRIS.HCl; 1mM EDTA.Na₂.2H₂O; q.s.p. 100 mL, pH 7,4), em tubos de microcentrífuga (1 a 2 milhões de células/mL), criopreservadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -196 °C. No momento da análise, as amostras foram descongeladas a 37 °C e adicionou-se 200µL de solução de TNE em tubo de microcentrífuga imersos em gelo. Imediatamente após, foram adicionados 400µL de solução ácido-detergente (0,1 mL Triton X-100; 0,877 g NaCl; 8 mL 1 N HCl; pH 1,4). Após 30 segundos, adicionou-se 600µL da solução de Laranja de Acridina (Molecular Probes Inc., USA) tamponada (0,1M ácido cítrico; 0,2 M fosfato de sódio; 0,15 M NaCl e 1mM EDTA; pH 6,0). Em seguida, alíquotas de 5µL desta solução foram colocadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus, Japão) utilizando o filtro de fluoresceína (450-490 nm, espelho dicromático de 510 nm). Um total de 200 espermatozóides/lâmina foi avaliado e classificado como: a) Espermatozóides com estruturas de cromatina anormal apresentavam a fluorescência vermelha e b) Espermato-

zoides com estruturas de cromatina normal apresentavam fluorescência verde.

Visando avaliar a ocorrência de estresse oxidativo espermático, as amostras de sêmen *in natura* e descongeladas foram submetidas ao teste de Nitroblue Tetrazolium (NBT; SALEH e AGARWAL, 2002). Inicialmente, as amostras foram diluídas (1:1; v:v) em solução de 10% de NBT (Sigma, USA) e incubadas durante 30 min à temperatura de 37 °C. A seguir, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente durante 30 min e centrifugadas a 250 x G (durante 5 min). Imediatamente após, o *pellet* foi diluído em solução Tris (3,605 g Tris; 2,024 g Ácido Cítrico; 1,488 g Frutose; q.s.p. 100 mL; pH 6,8) e efetuado o esfregaço. Após secagem à temperatura ambiente, 200 espermatozoides/lâmina foram contados em microscópio de contraste de fase (100X; Olympus, Alemanha), sob óleo de imersão, e classificados em: a) Espermatozoide portador de estresse oxidativo, quando identificada presença de formazana na peça intermediária e/ou cabeça espermática, e b) Espermatozoide sem estresse oxidativo, quando não foi identificada formazana na peça intermediária e na cabeça espermática.

Após análise macro e microscópica, o *pool* de amostras de sêmen foi diluído com Tris-Gema (Nutricell, Brasil) acrescido de antioxidantes, de acordo com grupo experimental, seguindo a ordem aleatória de criopreservação: G1) Tris-Gema (Grupo controle); G2) Tris-Gema + 600µM/L de vitamina C (L-ascorbic acid, Sigma, USA); G3) Tris-Gema + 60µM/L Trolox (-tocopherol, Aldrich, USA) e G4) Tris-Gema + 600µM/L de vitamina C + 60µM/L Trolox. Alíquotas de sêmen contendo 100 X 10⁶ espermatozoides foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e processadas em máquina de congelamento de sêmen (modelo TK 3000, TK Tecnologia em Congelamento Ltda, Brasil), utilizando a curva rápida de congelamento: -0,5 °C/minuto, de 25 °C a 5 °C, e a -12,5 °C/minuto, de 5 °C a -120 °C. As palhetas foram transferidas para o nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico (-196 °C).

As amostras foram descongeladas em banho-maria (37 °C, 30 segundos), diluídas em solução de Tris (1:1; v:v; 3,605 g Tris; 2,024 g Ácido Cítrico; 1,488 g Frutose; q.s.p. 100 mL; pH 6,8) e avaliadas quanto a MP e vigor espermático. Em seguida, o *pool* de cada grupo foi avaliado em triplicata para MP, vigor, integridade de acrossoma e DNA e estresse oxidativo após 0, 30 e 60 min de incubação a 37 °C.

A análise da perda de motilidade promovida pela incubação foi estimada pela taxa de degradação da motilidade (TDM) entre as médias obtidas imediatamente após a descongelamento (motilidade inicial, MI) e a motilidade após 60 min de incubação a 37 °C (Motilidade Final, MF), utilizando-se a equação de Maia (2006) para o cálculo da TDM, onde:

$$TDM = \frac{(MI - MF) \times 100}{MI}$$

As análises estatísticas foram realizadas usando o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000) através da análise de variância (ANOVA) em um delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 3 x 4 (três tempos x quatro grupos), verificando os diferentes grupos (G1, G2, G3 e G4) em três tempos (0, 30 e 60 min) para as variáveis motilidade (MP), integridade de acrossoma (IA) e estresse oxidativo (EOX). Efetuou-se contraste das médias pela diferença mínima significativa (d.m.s.), calculada pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. O vigor foi avaliado através do teste de Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%. Os percentuais de motilidade espermática, integridade acrossomal e estresse oxidativo foram transformados para arcoseno devido à distribuição heterogênea dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das amostras *in natura* de sêmen de carneiros Santa Inês, imediatamente após a formação do *pool*, apresentou 90,0±10,0% de MP, 4,5±0,5 de vigor,

94,13±2,3% de células com acrossoma íntegros, 99,0±1,0% de espermatozoides com DNA intacto e 66,0±10,2% de células espermáticas com estresse oxidativo. Durante o tempo de incubação pós-descongelamento (0,30 e 60 minutos), as análises de MP (Tabela 2) e vigor (Tabela 3) não evidenciaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os grupos adicionados com vitamina C ou Trolox, quando comparados ao Controle. No entanto, a análise de acrossoma dos espermatozoides (Tabela 4) demonstrou diferença significativa ($P<0,05$) entre grupos experimentais, após incubação a 37 °C, onde se constatou que o grupo G4 (vitamina C + Trolox) apresentou menor porcentual de células com acrossomas íntegros que o G1, G2 e G3. O estudo da presença de estresse oxidativo (Tabela

5) nas células espermáticas evidenciou diferença significativa ($P<0,05$) entre os grupos experimentais, com menor porcentual nas células do grupo G2 (vitamina C), demonstrando, segundo Donnelly et al. (1999), a habilidade em sua ação antioxidante para contrapor ao efeito do aumento da produção de vários tipos de ROS.

O tempo de incubação interferiu na viabilidade *in vitro* das células espermáticas ($P<0,05$), uma vez que, após 60 min de incubação a 37 °C, constataram-se menores percentuais de células com motilidade progressiva (Tabela 2) e com acrossomas íntegros (Tabela 4), além de maiores percentuais de espermatozoides portadores de estresse oxidativo (Tabela 5), quando comparados aos valores constatados imediatamente após a descongelamento.

TABELA 1 - Análise de variância para as variáveis motilidade progressiva, integridade do acrossoma e estresse oxidativo de espermatozoides de carneiros Santa Inês, criopreservados com diluente Tris-Gema acrescido de vitamina C e/ou Trolox, após 0, 30 e 60 min de incubação a 37 °C

Fonte de Variação	Motilidade Progressiva				Integridade do Acrossoma				Estresse Oxidativo			
	gl	SQ	QM	Valor de F	gl	SQ	QM	Valor de F	gl	SQ	QM	Valor de F
Total	35	1105,15	-	-	35	3916,69	-	-	35	684,69	-	-
Entre grupos (g)	3	195,27	65,09	2,78ns	3	1482,72	494,24	10,25**	3	106,14	35,38	4,06*
Entre tempos (t)	2	308,31	154,15	6,58*	2	1043,24	521,62	10,81**	2	366,84	183,42	21,05**
Interação (t x g)	6	39,12	6,52	0,28ns	6	232,99	38,83	0,80ns	6	2,59	0,43	0,05ns
Erro experimental	24	562,45	23,43	-	24	1157,73	48,24	-	24	209,11	8,71	-

gl: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio. * Significativo ($P<0,05$); ** Significativo ($P<0,01$); ns= não significativo ($P>0,05$).

TABELA 2 - Valores observados ($\bar{x} \pm dp$) para motilidade progressiva (MP) de espermatozoides de carneiros Santa Inês, criopreservados com diluente Tris-Gema acrescido de vitamina C e/ou Trolox, após 0, 30 e 60 min de incubação a 37 °C, de acordo com o tempo de incubação e o grupo experimental

Tempo de incubação (min)	Grupos				Média do Tempo
	G1	G2	G3	G4	
0	30,0 ± 10,0	28,3 ± 7,6	21,7 ± 2,9	21,7 ± 12,6	25,4a
30	26,7 ± 2,9	28,3 ± 5,8	18,3 ± 7,6	20,0 ± 5,0	23,3a
60	20,0 ± 5,0	15,0 ± 5,0	13,3 ± 5,8	15,0 ± 5,0	15,8b
Média do Grupo	25,6	23,9	17,8	18,9	21,55

G1= Tris-Gema; G2 = Tris-Gema + 600µM/L de vitamina C; G3 = Tris-Gema + 60µM/L de Trolox; G4 = Tris-Gema + 600µM/L de vitamina C + 60µM/L de Trolox; \bar{x} = média; dp = Desvio padrão; Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P<0,05$) entre as médias dos diferentes tempos de incubação; CV= 17,75%.

TABELA 3 - Valores observados ($\bar{x} \pm dp$) para vigor de espermatozoides de carneiros Santa Inês, criopreservados com diluente Tris-Gema acrescido de vitamina C e/ou Trolox, após 0, 30 e 60 min de incubação a 37 °C, de acordo com o tempo de incubação e o grupo experimental

Tempo de incubação (min)	Grupos				Média do Tempo
	G1	G2	G3	G4	
0	3,0 ±0,1	2,8 ±0,3	3,3 ±0,3	2,8 ±0,3	2,97
30	3,2 ±0,3	3,2 ±0,3	2,7 ±0,6	3,0 ±0,1	3,03
60	3,3 ±0,3	2,7 ±0,8	2,2 ±0,3	2,5 ±0,5	2,67
Média do Grupo	3,16	2,89	2,90	2,79	2,90

G1= Tris-Gema; G2 = Tris-Gema + 600µM/L de vitamina C; G3 = Tris-Gema + 60µM/L de Trolox; G4 = Tris-Gema + 600µM/L de vitamina C + 60µM/L de Trolox; \bar{x} = média; dp = Desvio padrão; CV= 6,93%.

TABELA 4 - Valores observados ($\bar{x} \pm dp$) para integridade de acrossoma (IA) de espermatozoides de carneiros Santa Inês, criopreservados com diluente Tris-Gema acrescido de vitamina C e/ou Trolox, após 0, 30 e 60 min de incubação a 37 °C, de acordo com o tempo de incubação e o grupo experimental

Tempo de incubação (min)	Grupos				Média do Tempo
	G1	G2	G3	G4	
0	70,2 ± 11,5	59,8 ± 3,8	53,8 ± 15,9	32,8 ± 12,7	54, 2A
30	58,8 ± 18,5	48,3 ± 11,1	37,3 ± 10,6	26,2 ± 9,9	42,7AB
60	34,2 ± 9,8	37,8 ± 11,4	36,7 ± 9,4	20,0 ± 4,8	32, 2B
Média do Grupo	54,4a	48,4a	42,6a	26,3b	43,03

G1= Tris-Gema; G2 = Tris-Gema + 600µM/L de vitamina C; G3 = Tris-Gema + 60µM/L de Trolox; G4 = Tris-Gema + 600µM/L de vitamina C + 60µM/L de Trolox; \bar{x} = média; dp= Desvio padrão; Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias dos diferentes tempos de incubação; Letras minúsculas distintas, na mesma linha, indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias dos grupos experimentais; CV= 17,03%.

TABELA 5 - Valores observados ($\bar{x} \pm dp$) para estresse oxidativo (EOX) de espermatozoides de carneiros Santa Inês, criopreservados com diluente Tris-Gema acrescido de vitamina C e/ou Trolox, após 0, 30 e 60 min de incubação a 37 °C, de acordo com o tempo de incubação e o grupo experimental

Tempo de incubação (min)	Grupos				Média do Tempo
	G1	G2	G3	G4	
0	75,7 ±2,0	70,3 ±2,5	76,8 ±2,5	71,3 ±1,8	73,5C
30	80,5 ±2,2	77,0 ±5,8	83,0 ±4,3	76,7 ±3,8	79,3B
60	85,7 ±3,5	82,2 ±6,2	86,8 ±4,0	83,0 ±3,3	84,4A
Média do Grupo	80,6ab	76,5b	82,2a	77,0ab	79,06

G1= Tris-Gema; G2 = Tris-Gema + 600µM/L de vitamina C; G3 = Tris-Gema + 60µM/L de Trolox; G4 = Tris-Gema + 600µM/L de vitamina C + 60µM/L de Trolox; \bar{x} = média; dp= Desvio padrão; Letras maiúsculas distintas, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias dos diferentes tempos de incubação; Letras minúsculas distintas, na mesma linha, indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre grupos experimentais; CV = 4,68%.

A média de espermatozoides com estresse oxidativo observada nas amostras de sêmen *in natura* (66,0%) sugere que estas células já apresentavam desequilíbrio entre as concentrações de ROS e de antioxidantes endógenos (SILVA et al., 2007), o qual foi intensificado durante o processo de congelamento e descongelamento, associado à redução dos percentuais de células com acrossomas íntegros. Estes resultados corroboram com os relatos de que a sobrevivência espermática pós-descongelamento depende da manutenção da integridade da membrana plasmática, do acrossoma, da atividade mitocondrial e dos constituintes nucleares (MAXWELL e WATSON, 1996; HOLT, 2000; WATSON, 2000). E, no caso deste experimento, além dos danos geralmente observados após a congelamento, os espermatozoides da espécie ovina apresentam baixa relação de ácidos graxos saturados/insaturados e menor concentração de colesterol, o que os torna mais sensíveis à refrigeração (NOILES et al., 1995).

Alterações funcionais da membrana espermática causadas pela congelamento podem reduzir o metabolismo celular (HOLT, 2000), através da depleção de ATP ou da ocorrência de danos aos elementos do axonema (De LAMIRANDE e GAGNON, 1995). Neste experimento, os danos ocorridos na membrana durante a congelamento determinaram aumento do percentual de células com estresse oxidativo, durante o período de incubação (60 min), sugerindo que os componentes dos diluidores (MAXWELL e WATSON, 1996), a curva de congelamento (KUMAR et al., 2003) e o protocolo de descongelamento (WATSON, 1995) não foram eficientes em preservar a qualidade espermática pós-descongelamento.

A taxa de degradação da motilidade (TDM), após 60 minutos de incubação a 37 °C, não evidenciou diferença estatística ($P > 0,05$) entre o grupo Controle (G1; 33,3%) e aqueles suplementados com vitamina C (G2; 46,00%), Trolox (G3; 39,00%), ou a associação de vitamina C e Trolox (G4; 30,4%), demonstrando que as concentra-

ções dos antioxidantes utilizadas (600µM de vit C e 60µM de Trolox) não foram suficientes para contrapor o efeito negativo do aumento da produção de ROS (AGARWAL et al., 2004; SILVA et al., 2007).

Beconi et al. (1993) relataram maior percentual de espermatozoides com acrossomas e mitocôndrias intactos ao adicionarem vitamina C (600 µM/L) ao diluente de criopreservação de sêmen bovino. Diferindo destes autores, neste estudo observou-se que os espermatozoides ovinos suplementados com vitamina C (G2) não apresentaram ($P > 0,05$) maior percentual de células com acrossomas íntegros, após incubação a 37 °C, quando comparados ao grupo Controle (G1).

Segundo Sönmez e Demirci (2004), a adição de ácido ascórbico (0,5; 1 e 2 mg/mL) promove efeito negativo na integridade do acrossoma de espermatozoides ovinos diluídos em Tris-gema contendo diferentes concentrações de glicerol (3, 5 e 7%) e submetidos a congelamento. Neste estudo observou-se que, apesar de não haver sido constatada diferença significativa ($P > 0,05$) entre o percentual de células com acrossomas íntegros do grupo Controle (G1) e do grupo tratado com vitamina C (G2), a média obtida foi numericamente inferior, demonstrando efeito negativo da adição de 600µM/L desta substância antioxidante. Resultado ratificado pela associação da vitamina C ao Trolox (G4), onde se constatou redução significativa ($P < 0,05$) do percentual de gametas com acrossomas íntegros, evidenciando não haver efeito benéfico na associação destas substâncias para evitar a peroxidação lipídica (DONELLY et al., 1999).

Uma vez que a vitamina E é o principal antioxidante de membrana (SILVA et al., 2007), neste experimento esperava-se que os grupos suplementados com Trolox (G3 e G4), análogo hidrossolúvel da vitamina E, apresentassem maior percentual de células com acrossoma íntegros. No entanto, independente do tempo de incubação, a adição de 60µM/L de Trolox isoladamente (G3), ou associado a 600µM/L de vitamina

C (G4), não protegeu as membranas acrossomais dos espermatozoides de ovinos, discordando dos resultados obtidos por Beconi et al. (1993), ao obterem maior porcentual de espermatozoides bovinos com acrossomas íntegros, ao adicionarem vitamina E (1 mg/mL acetato de α -tocoferol) ao diluente de congelamento.

Após a descongelamento, a análise de DNA evidenciou manutenção de sua integridade, uma vez que foram observados percentuais de espermatozoides com DNA íntegros ($98,6 \pm 0,2\%$, $CV = 3,58\%$) semelhantes aos constatados nas amostras de sêmen *in natura* ($99,0 \pm 1,0\%$). Assim, a manutenção desta estrutura, imediatamente após a descongelamento (0 min) e durante a incubação a 37 °C (60 min), pode ter ocorrido devido ao fato do grau elevado de compactação da cromatina espermática proporcionar proteção e manutenção de sua integridade, tornando-os mais resistentes às mutações e ao estresse ambiental (PERREAU et al., 1988), o que corrobora com os resultados observados por Peris et al. (2004) que, após descongelar espermatozoides ovinos e incubá-los por 3 horas a 38 °C, não detectaram danos ao DNA genômico.

Ressalta-se, ainda, que o estudo da interação grupo experimental x tempo de incubação (Tabela 1) não evidenciou efeito significativo ($P > 0,05$), demonstrando que o efeito dos antioxidantes utilizados não depende do tempo de incubação.

CONCLUSÕES

Considerando que o teste de termo-resistência é um bom indicador da viabilidade espermática no sistema genital feminino e os percentuais de espermatozoides com estresse oxidativo obtidos em amostras de sêmen criopreservadas em diluente Tris-gema, conclui-se que a adição de vitamina C ($600 \mu\text{M/L}$) pode ser utilizada para minimizar os efeitos negativos da criopreservação em espermatozoides ovinos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Ricardo Fellippe Figueira da Usina Utinga Leão, por disponibilizar os animais para execução deste estudo; ao Professor Lêucio Câmara Alves (UFRPE), pelo uso do microscópio de fluorescência para análise de integridade de acrossoma e de DNA; e ao Professor Pierre Castro Soares (UFRPE), pela colaboração nas avaliações estatísticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; NALLELA, K.P.; ALLAMANENI, S.S.R. et al. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Reproductive BioMedicine Online**, Cleveland, v. 8, p. 616-627, 2004.
- BECONI, M.T.; FRANCA, C.R.; MOR, N.G. et al. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 40, p. 841-851, 1993.
- BROUWERS, J.F.; SILVA, P.F. N.; GADELLA, B.M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 468-469, 2005.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 1996. 65 p. (Elaborado conforme convênio CBRA/MA n. 017/1996).
- De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 13, p. 368-386, 1995.
- DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effect of ascorbate and α -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. **Environmental Mutagenesis Society**, New York, v. 14, n. 5, p. 505-511, 1999.

- EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000. São Carlos, **Anais...** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, CD-Room, 2000.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, p. 3-22, 2000.
- 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**, San Diego, v. 46, p. 246-253, 2003.
- 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.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2006, 164 p. Tese de Doutorado.
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, p. 55-65, 1996.
- NOILES, E.E.; BAILEY, J.L.; STOREY, B.T. Temperature dependence of the water permeability, L_p , of murine sperm shows a discontinuity between 4° and 0 °C. **Cryobiology**, San Diego, v. 32, p. 220-238, 1995.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M. et al. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, p. 85-98, 2003.
- PERIS, S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M. et al. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 25, p. 224-233, 2004.
- PERREAULT, S.D.; BARBEE, R.R.; SLOTT, V.L. Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. **Developmental Biology**, New York, v.125, p. 181-186, 1988.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M. et al. Heterologous in vitro fertilisation and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 58, p. 475-482, 1998.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B. et al. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impaires the developmental competence of the embryo after first cleavage. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 609-619, 2007.
- SÖNMEZ, M.; DEMIRCI, E. The effect of ascorbic acid on the freezability of ram semen diluted with extenders containing different proportions of glycerol. **Turkish Journal of Veterinary Animal Science**, Ankara, v. 28, p. 893-899, 2004.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.481-92, 2000.