



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

Departamento de Ciências Agrárias

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIOXIDANTES
NA PROTECÇÃO CONTRA O STRESS OXIDATIVO E NA
VIABILIDADE ESPERMÁTICA DURANTE A CRIOPRESERVAÇÃO
DO SÉMEN EQUINO**

Marco Filipe Carreiro Braga

Angra do Heroísmo

Outubro de 2014



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

Departamento de Ciências Agrárias

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ANTIOXIDANTES
NA PROTECÇÃO CONTRA O STRESS OXIDATIVO E NA
VIABILIDADE ESPERMÁTICA DURANTE A CRIOPRESERVAÇÃO
DO SÉMEN EQUINO**

Proponente: Marco Filipe Carreiro Braga

Orientador: Professor Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva

Co-orientadora: Mestre Joanna Vasconcelos Franco

Angra do Heroísmo

Outubro de 2014

"The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Este e qualquer trabalho de investigação nunca são fruto de uma só pessoa. Ele nasce das ideias e princípios que várias mentes científicas criaram e desenvolveram ao longo dos anos, assim como de professores, alunos e cidadãos comuns da nossa comunidade. São a essas pessoas que agradeço todo o conhecimento adquirido, a nível pessoal e a nível profissional.

Ao Prof. Doutor Joaquim Fernando Moreira da Silva, orientador deste projecto, que desde cedo acompanhou a minha trajectória académica e me proporcionou grandes desafios que me ajudaram a tornar a pessoa que sou hoje em dia, e a todo o trabalho, paciência e respeito.

E porque atrás de um grande homem há sempre uma grande mulher, à Dr.^a Joanna Vasconcelos Franco, co-orientadora, agradeço pela sua destreza, incentivo e disponibilidade desde o primeiro dia. A ela, devo todo este projecto com a certeza que levo uma grande amizade.

A todos os professores de Engenharia e Gestão do Ambiente e Mestrado em Engenharia Zootécnica por todos os saberes que me foram transmitidos, em especial ao Prof. Doutor Henrique Rosa, que me ensinou que o caminho mais fácil nem sempre compensa. E a todos os meus colegas do laboratório de Reprodução Animal da Universidade dos Açores, que me acolheram na sua equipa e de braços abertos.

Existem pessoas que ao longo do meu percurso académico me marcaram de uma forma especial. Elas incentivaram-me como mais ninguém conseguiu, deram-me força para continuar, disseram-me inúmeras vezes “Tu consegues!”. E são essas pessoas, umas perto, outras já bem longe, que me fazem o amigo mais feliz do mundo: Catarina Meneses, Raquel Pereira, André Medeiros, Lady Vieira, Francisco Vieira, Beatriz Sá, as irmãs Barros, Leandra Basílio, Demian Nagler, Liliana Tavares, Diogo Araújo, Vasco Monteiro, Pedro Braz, Tanisha Sousa, Neide Xavier, Milton Teves, Tiago Noite, Stefano Silvi, Joana Lourenço, Gorka Giandinoto, Jorge Ponte e Luís Silva.

E, para as pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais Gilda e Dinis, e a minha irmã, Bárbara, a quem agradeço do fundo do meu coração todos os valores, amor, amizade e compreensão que qualquer filho pode desejar. Amo-vos tanto!

ABSTRACT

Semen's cryopreservation of mammals causes physical and chemical damage to cell membranes due to changes in the lipid phase transition, increased lipid peroxidation induced by reactive oxygen species (ROS) and mechanical stress in membranes of cells consequent to osmotic stress and temperature changes. Oxidative stress results in a reduction of Adenosine triphosphate (ATP) levels, which will lead to a lower motility and initiate lipid peroxidation.

To prevent or to avoid the destructive effects of ROS, seminal plasma has some scavengers of ROS, such as defensive enzymes and small antioxidant molecules. The problem comes when there is the need to centrifuge the stallion sperm before freezing and seminal plasma is removed, leaving the cells more vulnerable to oxidative damage.

Supplementation with α -tocopherol (vitamin E) and ascorbic acid (vitamin C) comes in order to realize if the semen quality after freezing/thawing have improvement in the various parameters. The α -tocopherol acts as a breaker of chains, neutralizing lipid radicals. The continuity of its function depends on α -tocopherol recyclers such as ascorbate and thiol. On the other hand, the ascorbic acid acts as a scavenger, and has been found to have a positive effect on the preservation of the integrity of the membrane of cold equine semen.

The aim of this study was to investigate the effects of ascorbic acid and α -tocopherol supplementation on semen quality parameters of equine thawed-frozen semen.

The semen was collected from three stallions (two ejaculates for each) by the traditional method, using an artificial vagina. The gelatinous fraction of semen was retained in the collectors filter, as well as any dirt present in the penis and semen of the stallions. After collection, the semen was diluted in a portion of 1:1 with Kenney medium (from milk powder) and transported to the laboratory in the shortest possible time in order to evaluate them. Semen with a motility below 70% was rejected for research.

Semen was divided in seven different treatments in a final concentration of 100×10^6 sperm/mL using Gent® extender containing no supplements (control) and the following supplements with three different concentrations: α -tocopherol (0.5, 1 and 2

mM) and ascorbic acid (0.45, 0.9 and 1.8 g/L). After thawing, all samples were maintained at 37°C, while analyzes were performed at time 0, 60 and 120 minutes.

The evaluation of viability and acrosome status (pisum sativum agglutinin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC-PSA) and propidium iodide (PI)), mitochondrial membrane potential (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodine (JC-1)), membrane lipid peroxidation (LPO) (C₁₁-BODIPY^{581/591}) and stability of the plasmatic membrane (Merocyanine 540 and Yo-Pro-1) of each samples was determined by flow cytometry.

Relative to the control group, supplementation with α -tocopherol improved ($P \leq 0.05$) post-thaw membrane LPO, yet the higher concentrations of ascorbic acid (0.9 and 1.8 g/L) showed a negative effect in membrane LPO. Neither antioxidant significantly increased ($P > 0.05$) the acrosome integrity and mitochondrial membrane potential of frozen-thawed spermatozoa, although supplementation with α -tocopherol and ascorbic acid (0.9 and 1.8 g/L) had a positive effect in membrane integrity and stability ($P \leq 0.05$). For all the semen parameters the lower concentration of ascorbic acid (0.45 g/L) did not showed significant differences ($P > 0.05$) as compared with the control.

In conclusion, α -tocopherol seems to be an efficient antioxidant reducing the oxidative stress provoked by cryopreservation, decreasing lipid peroxidation on equine spermatozoa.

Keywords: Semen, Equine, α -tocopherol, Ascorbic acid, Cryopreservation

RESUMO

A criopreservação de sémen de mamíferos causa danos físicos e químicos às membranas das células, devido às alterações verificadas na transição da fase lípida, aumento da peroxidação lipídica induzida pelas espécies reactivas oxigenadas (ERO) e stresse mecânico nas membranas das células consequente ao stresse osmótico e mudanças de temperatura. O stresse oxidativo resulta numa diminuição dos níveis de Adenosina trifosfato (ATP), o que vai levar a uma motilidade mais baixa e iniciar a peroxidação lipídica.

Para prevenir que isso aconteça, ou seja, para evitar os efeitos destrutivos das ERO, o plasma seminal possui alguns *scavengers* de ERO, tais como enzimas defensivas e pequenas moléculas antioxidantes. O problema vem quando existe a necessidade de centrifugar o sémen e remover o plasma seminal antes da congelação, deixando as células mais vulneráveis a danos oxidativos.

A suplementação de α -tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C) chega com o intuito de perceber se a qualidade do sémen, após a descongelação, tem melhoria nos seus diversos parâmetros. O α -tocoferol funciona como um quebrador de cadeias, neutralizando os radicais lipídicos. A continuidade da sua função vai depender de recicladores de α -tocoferol, como ascorbato e tiol. Por outro lado, o ácido ascórbico funciona como um *scavenger*, sido já verificado que tem um efeito positivo na preservação da integridade da membrana de sémen equino refrigerado.

O presente trabalho teve como objectivo determinar o efeito da suplementação de α -tocoferol e ácido ascórbico sobre a qualidade dos parâmetros espermáticos após criopreservação de sémen equino.

O sémen foi colectado de três garanhões (dois ejaculados por cada um) pelo método tradicional, usando uma vagina artificial. A fracção gelatinosa do sémen foi retida no filtro presente nos copos colectores, assim como alguma sujidade presente no pénis e sémen do garanhão. Após a colheita, o sémen foi diluído numa porção de 1:1 com o meio Kenney (à base de leite desnatado em pó) e transportado para o laboratório no menor tempo possível de modo a proceder à sua avaliação.

Após a colheita, realizou-se a avaliação física e morfológica do sémen: volume, aspecto, motilidade, vigor e concentração espermática. Sémen com uma motilidade inferior a 70% foi considerado inapto para a investigação

Primeiramente, na chegada ao laboratório, o sémen foi centrifugado a uma velocidade de 600 xg durante 10 minutos, de forma a remover o plasma seminal. A contagem das células foi efectuada no microscópio numa câmara de Neubauer. O sémen foi então ressuspenso a uma concentração de 100×10^6 espermatozóides/mL num meio de congelação comercial chamado Gent®. Após a diluição, este foi dividido em sete tubos de Falcon para os diferentes tratamentos: três concentrações diferentes de α -tocoferol (0.5, 1 e 2 mM) e de ácido ascórbico (0.45, 0.9 e 1.8 g/L), e o controlo.

As amostras foram então guardadas em palhinhas de 0,25ml e congeladas a uma velocidade de $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ dos 20°C - 5°C , $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ dos 5°C aos -15°C e, finalmente, uma velocidade de $-25^\circ\text{C}/\text{min}$ dos -15°C aos -150°C . As amostras foram descongeladas colocando-as em banho-maria a 37°C durante 30 segundos e posteriormente encubadas à mesma temperatura durante 0, 60 e 120 minutos para o início da análise.

A avaliação da viabilidade e reacção acrossómica (FITC-PSA e PI), do potencial da membrana mitocondrial (JC-1), da peroxidação da membrana lipídica (C₁₁-BODIPY581/591), e da estabilidade da membrana plasmática (merocianina 540 e Yo-Pro-1) de cada amostra foi determinada através de citometria de fluxo.

Os resultados mostraram que, relativamente ao grupo controlo, a suplementação do α -tocoferol melhorou ($P \leq 0.05$) a peroxidação da membrana lipídica após a descongelação, mas as concentrações mais elevadas de ácido ascórbico (0.9 e 1.8 g/L) apresentaram um efeito negativo. Apesar de nenhum dos antioxidantes ter demonstrado uma melhoria ($P > 0.05$) na integridade do acrossoma e no potencial da membrana mitocondrial, verificou-se que as amostras suplementadas com α -tocoferol e ácido ascórbico (0.9 e 1.8 g/L) apresentaram um efeito positivo na integridade e estabilidade da membrana plasmática ($P \leq 0.05$). Para todos os parâmetros seminais, a concentração mais baixa de ácido ascórbico (0.45 g/L) não demonstrou diferenças significativas comparativamente ao controlo.

Posto isso, concluímos que o α -tocoferol demonstra ser um antioxidante eficaz na redução do stresse oxidativo provocado pela criopreservação, diminuindo a peroxidação lipídica no sémen equino.

Palavras-chave: Sémen, Equinos, α -tocoferol, Ácido ascórbico, Criopreservação

CONTEÚDO

	Página
Agradecimentos.....	i
Abstract.....	ii
Resumo.....	iv
Conteúdo.....	vii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Siglas.....	xii
Lista de Símbolos.....	xiv
Lista de Programas.....	xv
I – INTRODUÇÃO.....	1
II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1. Equinos.....	5
1.1.Taxonomia.....	5
1.2.Etologia.....	5
1.3.Fisiologia e anatomia do aparelho reprodutor.....	5
2. Sémen.....	7
3. Criopreservação.....	9
3.1.Definição.....	9
3.2.História.....	9
3.3.Refrigeração e Congelação.....	10
3.3.1. Principais Variáveis.....	10
3.3.2. Taxas de refrigeração.....	11
3.3.3. Crioprotetores.....	11
4. Stresse Oxidativo.....	12

4.1.	Definição.....	12
4.2.	Espécies Reactivas Oxigenadas.....	12
4.3.	Oxidação de lípidos.....	13
4.4.	Oxidação de proteínas.....	15
4.5.	Modificações e quebra de ligações de ADN.....	15
4.6.	Mecanismo de combate ao stresse oxidativo.....	16
4.7.	Antioxidantes.....	17
4.7.1.	α -tocoferol.....	17
4.7.2.	Ácido ascórbico.....	18
5.	Avaliação do potencial de fertilidade de sémen.....	18
5.1.	Fertilização <i>in vitro</i>	20
5.1.1.	Definição.....	20
5.1.2.	História.....	21
5.2.	Citometria de fluxo.....	22
5.2.1.	Definição e funcionamento.....	22
5.2.2.	Marcadores.....	22
III –	METODOLOGIA.....	24
1.	Colheita e avaliação do sémen.....	25
1.1.	Reagentes.....	25
1.2.	Colheita e processamento.....	25
1.3.	Primeira avaliação em laboratório.....	25
1.3.1.	Motilidade.....	25
1.3.2.	Vigor Espermático.....	26
2.	Processo de criopreservação.....	27
3.	Descongelação e avaliação.....	27
3.1.	Descongelação.....	27
3.2.	Avaliação do sémen.....	27
3.2.1.	Estado do acrossoma e viabilidade espermática.....	28
3.2.2.	Potencial da membrana mitocondrial.....	28
3.2.3.	Peroxidação lipídica.....	29
3.2.4.	Estabilidade da membrana.....	29
3.3.	Análise estatística.....	30

IV – RESULTADOS	31
1. Estado do acrossoma e viabilidade espermática	32
2. Potencial da membrana mitocondrial	34
3. Peroxidação lipídica.....	36
4. Estabilidade da membrana.....	38
V – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	40
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
VII – ANEXOS.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo do processo de Espermatogénese.....7

Figura 2 - Constituição de um espermatozóide de mamífero.....19

Figura 3 - Alterações morfológicas na cabeça dos espermatozóides mamíferos durante a reacção acrossómica.....20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da coloração do FICT-PSA e PI na avaliação do estado do acrossoma e viabilidade espermática.....32

Tabela 2: Avaliação por citometria de fluxo da viabilidade e estado do acrossoma (Média \pm SEM); acrossoma intacto vivo (AIV), acrossoma intacto morto (AIM), acrossoma reactivo vivo (ARV) e acrossoma reactive morto (ARM), depois da descongelação de sémen com diferentes concentrações de α -tocoferol (mM) e ácido ascórbico (g/L) em meio de congelação, em três tempos de incubação diferentes.....33

Tabela 3: Avaliação por citometria de fluxo do potencial da membrana mitocondrial (PMM) (Média \pm SEM) depois da descongelação de sémen com diferentes concentrações de α -tocoferol (mM) e ácido ascórbico (g/L) em meio de congelação, em três tempos de incubação diferentes.....35

Tabela 4: Avaliação por citometria de fluxo da peroxidação lipídica da membrana (Média \pm SEM) depois da descongelação de sémen com diferentes concentrações de α -tocoferol (mM) e ácido ascórbico (g/L) em meio de congelação, em três tempos de incubação diferentes.....37

Tabela 5: Avaliação por citometria de fluxo da estabilidade da membrana (Média \pm SEM); células viáveis com estabilidade da membrana plasmática (SMYo-PRO-1 (-)), células viáveis sem estabilidade da membrana plasmática (NSMYo-PRO-1 (-)) e células mortas (Yo-PRO-1 (+)), depois da descongelação de sémen com diferentes concentrações de α -tocoferol (mM) e ácido ascórbico (g/L) em meio de congelação, em três tempos de incubação diferentes.....39

LISTA DE SIGLAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AIM: Acrossoma intacto morto

AIV: Acrossoma intacto vivo

ANOVA: Análise de variância

ARM: Acrossoma reactivo morto

ARV: Acrossoma reactivo vivo

ATP: Adenosina trifosfato

C₁₁-Bodipy^{581/591}: *4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid*

DSB: *Double stand break*

ERO: Espécies reativas de oxigênio

FITC-PSA: *pisum sativum agglutinin conjugated to fluorescein isothiocyanate*

FIV: Fertilização *in vitro*

FSC: *Forward scatter*

FSH: Hormona estimulante folicular

GnRH: Hormona libertadora de gonadotropina

GPx: Glutaciona peroxidase

GR: Glutaciona peroxidase

GSH: Glutaciona

HO[•]: Radical hidroxilo

HO₂[•]: Radical hidroperoxilo

JC-1: *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocianyne iodine*

LH: Hormona luteinizante

LPO: Peroxidação lipídica

M540: Merocianina 540

PBS: *Phosphate-buffered saline*

PI: Iodeto de propídio

PMM: Potencial da membrana mitocondrial

PUFA: Ácidos gordos polinsaturados

ROS: *Reactive oxygen species*

SEM: Erro padrão

SSB: *Single stand break*

SSC: *Side scatter*

SOD: Superóxido dismutase

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus Celcius

% - percentagem

x - vezes

10^6 - milhões

: - para

® - marca registada

< - menor que

> - maior que

± - mais ou menos

- - menos/negativo

+ - mais/positivo

= - igual

LISTA DE PROGRAMAS

IBM SPSS®v.19 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)

Cellquest®software (Becton Dickinson, San Jose, California, USA)

I – INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos tem-se verificado um aumento do uso de sémen equino congelado para inseminação artificial, sendo uma tecnologia de grande importância para a produção equina, pois permite o armazenamento e transporte de sémen a longo prazo.

Independentemente da localização ou da disponibilidade do garanhão, a criopreservação de sémen equino permite preservar sémen de animais geneticamente superiores e, assim, desenvolver um programa de produção sustentável. Além disso, possibilita controlar ou erradicar doenças infecciosas.

Uma das principais vantagens da criopreservação de sémen equino passa pela facilidade com que os produtores podem facilmente inseminar uma fêmea num ponto ótimo de produção do que esperar pela disponibilidade do sémen do garanhão. A criopreservação permite ainda criar bancos genéticos de forma a apoiar a biodiversidade e protecção de espécies em perigo.

Contudo, a criopreservação também apresenta algumas dificuldades. A capacidade fertilizante do espermatozóide é geralmente mais baixa do que outras espécies domésticas, em que cerca de 40-50% dos espermatozoides não sobrevivem ao processo de congelação/descongelação (Watson, 2000).

Apesar dos estudos e esforços que os cientistas tiveram nos últimos anos, essa tecnologia ainda não está num nível ótimo de desenvolvimento, causando danos químicos e físicos à integridade, bioquímica e biofísica da estrutura dos espermatozoides, dano esse que pode acabar por ser letal para os mesmos.

Existem diversos factores que podem influenciar os danos que as células sofrem no processo de criopreservação, tais como stresse oxidativo, mudanças de capacitação e apoptose e stresse mecânico nas membranas das células devido ao stresse osmótico, além das mudanças de temperatura que ocorrem durante o processo de congelação/descongelação. Esses processos podem contribuir para a morte dos espermatozoides ou a sua redução de fertilidade (Sieme et al., 2008; Ortega Ferrusola, 2009; Mara et al., 2013).

O sucesso da criopreservação de sémen de garanhão não tem sido constante uma vez que existem diferentes regimes de congelação e novos protocolos designados e publicados para melhorar a qualidade do sémen pós-descongelação. Todavia, não existe nenhum protocolo ideal para todos os casos, sendo a complexidade da biologia dos

espermatozóides um importante factor em desenvolver melhorias na criopreservação de sémen.

O aumento da peroxidação lipídica da membrana é induzido por espécies reactivas oxigenadas (ERO), assim como stresse osmótico e choque térmico. A susceptibilidade dos espermatozóides ao dano oxidativo é atribuída às diferenças individuais na composição de ácidos gordos da membrana das células espermáticas (depende da proporção de ácidos gordos saturados e polinsaturados nos fosfolípidos da membrana das células) (García, et al., 2011), assim como à capacidade antioxidante limitante e a habilidade que as células têm de gerar ERO (Silva, et al., 2010).

O plasma seminal é uma grande fonte de *scavengers* de ERO, que funciona como protector das células espermáticas através de enzimas de defesa como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, assim como pequenas moléculas antioxidantes como ácido ascórbico e α -tocoferol (Aitken & Baker, 2004). Contudo, o plasma seminal deve ser removido pois contém água que pode danificar as células no processo de criopreservação, através da formação de cristais.

Desta forma, para combater o stresse oxidativo, choque térmico e choque osmótico, processos responsáveis pelo dano celular, deve-se achar novos métodos de criopreservação.

O objectivo do estudo desta tese passa por melhorar o processo de criopreservação de sémen de garanhão. Foi dada como hipótese que a adição de antioxidantes (α -tocoferol e ácido ascórbico) em diferentes concentrações no meio de congelação poderia melhorar algumas características funcionais das células espermáticas após congelação/descongelação: integridade do acrossoma, estabilidade da membrana plasmática e peroxidação lipídica da membrana.

II – REVISÃO DE LITERATURA

1. EQUINOS

1.1. Taxonomia

Nascido a 29 de Outubro de 1831, o palentólogo americano Othniel Charles Marsh foi um dos principais cientistas em classificar o género *Equus*, pertencente à família *Equidae*. O seu trabalho passou, essencialmente, por criar uma linha evolutiva desde género, desde os tempos primitivos até aos modernos.

A família *Equidae* pertence à ordem *Perissodactyla*, que é caracterizada pelos mamíferos ungulados que têm um número ímpar de dedos nas patas.

O género *Equus* inclui, além dos cavalos, as zebras e os burros. Os cavalos comuns, que foram utilizados neste estudo, têm como nome científico *Equus ferus caballus*.

1.2 Etologia

Etologia é o ramo da ciência que estuda o comportamento natural dos animais. O conhecimento pelas suas reacções naturais e instintivas acaba por ser importante para que possamos proporcionar ao animal um equilíbrio físico e psicológico de qualidade.

Os equídeos dormem cerca de quatro horas por dia, não de uma só vez, e só adormecem quando se sentem num ambiente seguro. Estes animais, para estarem bem, além de conforto e boa nutrição, necessitam de estar livres de dor, doenças e stresse.

O estudo do comportamento dos garanhões e éguas é essencial para a reprodução nesses animais, particularmente na detecção do cio nas fêmeas e o processo da colheita de sémen. O garanhão pode tornar-se agressivo no momento da recolha se estiver com níveis elevados de stresse assim como a égua pode recusar o salto do garanhão se esta não estiver na fase Estro do ciclo menstrual.

1.3 Fisiologia e anatomia do aparelho reprodutor

O sistema reprodutor das fêmeas é composto por dois ovários, dois ovidutos, dois cornos uterinos, corpo do útero, vulva, vagina cérvix e glândula mamária.

A égua é classificada como poliéstrica estacional de Primavera/Verão pois são nessas alturas que estão sujeitas a mais horas de luz solar. O aumento da luminosidade e fotoperíodo resulta na diminuição da produção de melatonina, que se dá pela glândula pineal que, por sua vez, estimula o hipotálamo. Uma vez estimulado, o hipotálamo secreta GnRH (hormona libertadora de gonadotrofina), favorecendo a libertação de LH (hormona luteinizante) e FSH (hormona folículo-estimulante) por parte da hipófise. Estimulados pela FSH, os folículos ováricos desenvolvem e produzem estrogénio, hormona responsável pelo comportamento sexual das fêmeas. A produção de estrogénio está directamente relacionada com o tamanho dos folículos, sendo o seu máximo registado por da ovulação. Quando isso acontece, dá-se o fenómeno conhecido por cio. Em Portugal ainda não existem muitos dados relativos ao padrão anual da reprodução das éguas de raça Lusitanas, contudo éguas que são mantidas à latitude 39°12'N tendem a entrar, no Inverno em anestro. Contudo, éguas com boa condição corporal podem ciclar durante essa estação (Silva, et al., 2007).

À semelhança de outros mamíferos, o sistema reprodutor do garanhão engloba dois testículos, epidídimo, canal deferente, pénis, prepúcio, uretra e três glândulas secundárias: vesículas seminais, próstata e glândula de Cowper. As vesículas seminais são responsáveis pela produção de sémen, assegurando o transporte e nutrição dos espermatozóides, enquanto a próstata neutraliza o pH ácido da vagina das fêmeas. Não menos importante é a glândula de Cowper, que tem com principal função a limpeza da uretra, além de lançarem, depois da ejaculação, um “espermicida” que dificulta a fecundação daquelas fêmeas por outros machos (Klein, 2012).

Inicialmente, o mecanismo hormonal é semelhante ao das fêmeas, onde se verifica a libertação de FSH e LH da hipófise, após produção de GnRH pelo hipotálamo. A FSH tem como alvo as células de Sertoli, que lançam proteínas responsáveis pela produção e diferenciação dos espermatozóides, enquanto a LH atua nas células de Leydig, culminando na produção de testosterona. Tal como o efeito da progesterona nas fêmeas, a testosterona regula o comportamento sexual do garanhão, assim como a manutenção dos caracteres sexuais secundários (Klein, 2012).

2. SÉMEN

O sémen é um fluido orgânico produzido pelos machos de várias espécies, incluindo os garanhões, sendo constituído por espermatozóides (célula reprodutora masculina), líquido seminal e líquido prostático.

A espermatogénese, processo pela qual dá-se a produção de espermatozóides, tem lugar nos tubos seminíferos dos testículos. Todo esse processo é dividido em quatro fases, sendo cada uma delas dependente da sua antecessora.

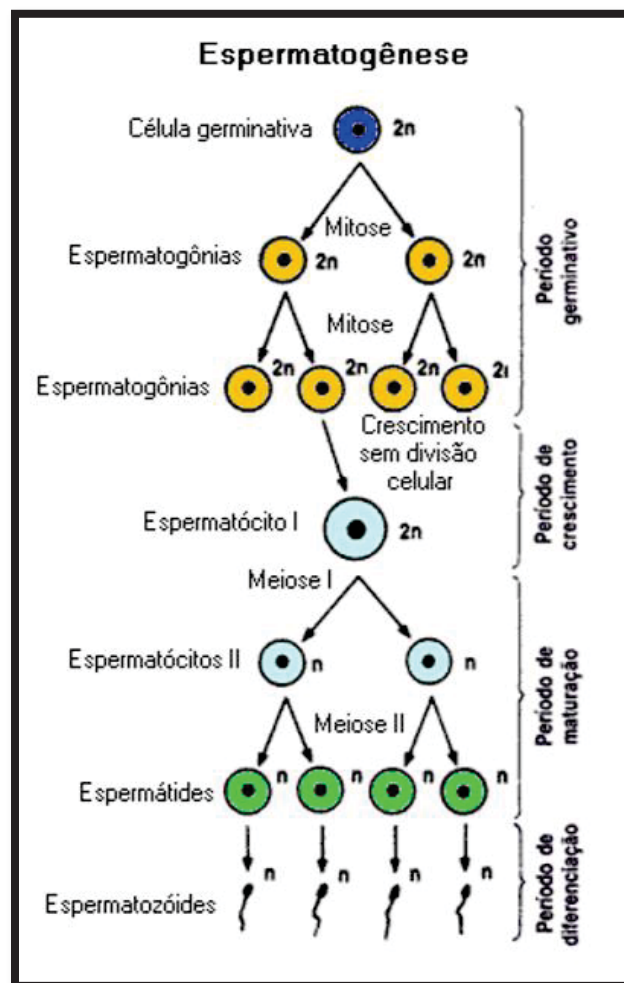


Fig. 1 - Esquema representativo do processo de Espermatogénese. Adaptado de

<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/nucleo15.php>.

A primeira fase, conhecida por Multiplicação, consiste na proliferação das espermatogónias por mitoses sucessivas. Na segunda fase, Crescimento, algumas

espermatogóneas avolumam-se em consequência da síntese e acumulação de reservas. A fase de crescimento termina com a origem dos espermatócitos I. Segue-se a Maturação, que nada mais é do que a divisão celular dessas células por meiose, compreendida em divisão 1 (originando células haplóides, designados por espermatócitos II) e divisão 2 (resultando em espermátides). Por fim dá-se a Diferenciação das espermátides em espermatozóides. Essa transformação acontece devido à perda de grande parte do citoplasma por fagocitose das células de Sertoli e os organelos citoplasmáticos sofrem uma reorganização a nível do complexo de Golgi (forma o acrossoma), dos centríolos (origina os microtúbulos do flagelo) e das mitocôndrias (fornece energia que permite o movimento do flagelo) (Moreira, 2010).

Terminada a espermatogénese, os espermatozóides já estão formados e são libertados para o lúmen dos túbulos seminíferos e finalizam a sua maturação nos epidídimos. Agora com mobilidade e capacidade de fertilização, os espermatozóides estão prontos para se descolarem até aos canais deferentes, misturando-se com as secreções das vesículas seminais e da próstata, formando o esperma, que é libertado no decurso da ejaculação (Moreira, 2010).

O ejaculado de um garanhão tem um volume de 50 – 100 ml e uma concentração de $150 - 300 \times 10^6$ spz/ml (Klein, 2012), sendo formado por cinco a oito jactos.

O sémen é constituído por três fracções, sendo a primeira originária das glândulas bulbouretrais. Esta fracção normalmente não apresenta espermatozóides. A segunda fracção é rica nesse tipo de células, além de secreções prostáticas e ampolares. A terceira e última fracção é composta, essencialmente, pela secreção das vesículas seminais. É importante referir que aproximadamente 70% dos espermatozóides são expulsos nos três primeiros jactos.

Os espermatozóides têm de apresentar certas características de forma a considera-los aptos para fertilização. Entre esses atributos destaca-se a morfologia aceitável, mobilidade progressiva, membranas plasmáticas e acrossomas estabilizadas e presença de enzimas para fertilização (Klein, 2012). O exame andrológico reflecte as actuais condições reprodutivas de um macho (Papa, et al., 2007). A avaliação destina-se à observação das condições semiológicas, bem como condições de sanidade, alterações genéticas, saúde geral, deficiências nas cópulas por alterações locomotoras ou alterações do sistema genital e problemas espermáticos (Papa, et al., 2007).

Quando o sémen é colectado de forma artificial e, posteriormente, congelado ou refrigerado, deve-se sempre realizar um exame andrológico (Ver anexo 1).

3. CRIOPRESERVAÇÃO

3.1. Definição

Criobiologia é o estudo dos efeitos das baixas temperaturas em organismos vivos (Read, 1999).

3.2. História

Desde o Antigo Egipto, há cerca de 2.500 anos, que o uso do frio na medicina é utilizado. Contudo, só no século V A.C. é que o físico grego Hipócrates apontou que o uso do frio poderia aliviar a dor em feridas e certas doenças que afectavam os ossos e os tendões (Yang & Mochizuki, 2003).

Em meados do século XVII, Henry Power descobriu que o frio acabava por ser benéfico para a preservação de substâncias após congelar nematóides de vinagre em água salgada, verificando que elas estavam tão activas quanto antes da refrigeração. Outro cientista que permitiu o avanço da criobiologia no século seguinte foi Lazzarro Spallanzani, que investigou minuciosamente os tecidos de várias espécies e a sua reacção a baixas temperaturas (Sittig, 1963).

Mais avanços foram dados no século XIX quando em 1851, James Arnott, por muitos considerado o pai da criobiologia, conseguiu temperaturas de -24°C usando uma solução de gelo e sal para o tratamento de várias condições de superfície (Yang & Mochizuki, 2003).

Todavia, só no século passado é que há os primeiros indícios da criopreservação de células sexuais. Christopher Polge, juntamente com os seus colegas da Universidade de Cambridge, descobriram as capacidades protectivas do glicerol após usarem garrafas de químicos que estavam, acidentalmente, sem rótulo. Essa descoberta permitiu-os criopreservar, com sucesso, sémen de galinha e bovino (Polge., et al., 1949), o que

levou em 1951 ao nascimento do primeiro bezerro por inseminação artificial (Stewart, 1950).

Recentemente, a criopreservação de sémen equino tem muito mais sucesso do que há uns anos atrás. O avanço da tecnologia e dos vários investigadores na área permitiram resolver alguns problemas, contudo, o sémen de garanhão continua a ser muito sensível e, ao contrário do que acontece com os bovinos, ainda não tem grande capacidade de fertilização, isso porque os espermatozóides dos equinos e dos bovinos são biofísica e bioquimicamente diferentes . Um estudo conduzido por Tischner, em 1979, revelou que apenas 20% do sémen congelado e descongelado se encontrava em boas condições, outros 60% encontrava-se afectado e os restantes 20% irrecuperáveis (Varner, 2000).

3.3. Refrigeração e Congelação

3.3.1. Principais variáveis

O congelamento desprotegido é normalmente letal, contudo existem mecanismos envolvidos que podem demonstrar como o arrefecimento pode ser usado para produzir condições estáveis para a criopreservação. Os efeitos biológicos de arrefecimento são dominados pela congelação da água, o que resulta na concentração dos solutos que são dissolvidos na fase líquida que resta. Daí nascem duas teorias em relação ao dano resultante do congelamento: a primeira dita que cristais de gelo perfuram ou desmembram as células, destruindo-as por acção mecânica directa, e a segunda diz que o dano é de efeitos secundários através de mudanças na composição da fase líquida (Pegg, 2007).

Existem vários métodos de criopreservação, sendo eles (1) criopreservação a -196°C, (2) armazenamento congelado a temperaturas acima dos -196°C, (3) criodessecação e (4) vitrificação. A viabilidade do material criopreservado a -196°C não está dependente do tempo em que ele está armazenado. Existem espermatozóides de bovinos que estão armazenados há mais de 50 anos e mesmo assim não demonstram redução na sua viabilidade. Por outro lado, quando o material é armazenado nos congeladores convencionais, que podem chegar até -130°C, perde viabilidade a longo

prazo, apesar de ser um método mais simples do que usar azoto líquido como no processo a -196°C . A criodessecação seria um bom processo na medida em que evitaria a congelação do material, não fosse o facto desse processo ser altamente mutagénico e apresentar decréscimo da viabilidade ao longo do tempo. Por fim, a vitrificação é o processo pela qual não se dá formação de gelo pois combina o uso de soluções concentradas com um rápido arrefecimento. Este processo já é usado na preservação de oócitos (Özkavukcu & Erdemli, 2002).

3.3.2. Taxas de refrigeração e congelação

A criopreservação de células e outros sistemas biológicos possuem uma taxa específica de refrigeração ideal, com diminuição da sobrevivência a taxas que são muito baixas (dano de arrefecimento lento) ou muito altas (dano de arrefecimento rápido) (Mazur, et al., 1972).

Quando a temperatura do sémen diminui, formam-se cristais de gelo extracelulares, resultando numa maior concentração de solutos extracelulares. O gradiente osmótico resultante causa desidratação da célula uma vez que a água movimenta-se para o exterior da mesma. Pode ocorrer danos se o gradiente osmótico da célula for muito abrupto, que por sua vez faz com que a água intracelular saia rapidamente da célula. O excesso de desidratação aumenta a concentração de solutos intracelular, o que pode ser tóxico para as células. Desta forma, se a quantidade necessária de água intracelular não for removida antes da formação de cristais de gelo intracelulares, os organelos e o citoesqueleto estão sujeitos a danos irremediáveis. (Mazur, et al., 1972).

Para a criopreservação de sémen equino, as taxas de refrigeração/congelação segundo o método de Nield et al. são as seguintes: de $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ dos 20°C - 5°C , $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ dos 5°C aos -15°C e uma velocidade de $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ dos -15°C aos -150°C , e depois colocado em azoto líquido, que se encontra a -196°C (Sikka, 2004).

3.3.3. Crioprotetores

Os crioprotetores são usados de forma a reduzir o dano celular devido ao choque térmico que ocorre durante o congelamento e descongelamento (Cavalcanti, et al., 2002). As propriedades gerais desses crioprotetores passam por terem baixo peso molecular e não serem tóxicos. Esses aditivos alcançam os seus efeitos protectores ao aumentar a sua fracção descongelada a uma determinada temperatura e, assim, reduzir a sua composição iónica (Özkavukcu & Erdemli, 2002).

Existem agentes crioprotetores penetrantes e não penetrantes. Os não penetrantes são representados por macromoléculas com alto peso molecular, como por exemplo os açúcares, a lipoproteína da gema do ovo, as proteínas do leite e alguns aminoácidos. Os penetrantes têm propriedades coligativas ou propriedades de ligação com a molécula da água, ou seja, os agentes crioprotetores penetrantes têm estruturas que promovem ligações de hidrogénio com a molécula da água, impedindo o crescimento de cristais dentro da célula (Ferreira, 2008).

O glicerol, um álcool polihídrico muito permeável, é o crioprotetor mais utilizado na criopreservação de sémen da maior parte dos animais domésticos (Farstad, 1996). Contudo, têm sido avaliados crioprotetores alternativos com menor peso molecular e maior permeabilidade da membrana que o glicerol, de forma a minimizar os danos osmóticos dos espermatozóides (Squires, et al., 2004).

4. STRESSE OXIDATIVO

4.1. Definição

Stresse Oxidativo é uma condição associada com o aumento da taxa de dano celular induzida por oxigénio e oxidantes derivados do oxigénio conhecidos por ERO (Espécies Reactivas Oxigenadas) (Sikka, et al., 1995).

4.2. Espécies Reactivas Oxigenadas

Os espermatozóides maduros e imaturos, células ‘redondas’ originárias de diferentes fases da espermatogénese, leucócitos e outros tipos de células, tais como células epiteliais, são considerados células seminais. Entre estes, os espermatozóides imaturos e os leucócitos são as principais fontes de Espécies Reactivas Oxigenadas (Garrido, et al., 2004).

Os radicais livres, substâncias que têm um número ímpar de electrões, são fortemente energéticos e instáveis. Estes perdem um electrão em consequência da acção directa de uma fonte luminosa ou então pelo contacto com o oxigénio (Silva, et al., 2013).

Diversos factores podem ser responsáveis pelo desencadeamento do stresse oxidativo, a partir do princípio que o stresse oxidativo emerge do aumento da produção de ERO e a redução de antioxidantes disponíveis. Uma nutrição com escassez de antioxidantes, a sujeição de animais a condições de stresse, a colheita de sémen e a geração natural de ERO nos espermatozóides são alguns desses factores (Pena, et al., 2009).

A membrana plasmática dos espermatozóides possui uma elevada concentração de ácidos gordos polinsaturados, o que faz dessas células potenciais alvos para os efeitos degenerativos causados pelas ERO (Aurich, 2005). Uma das hipóteses para a formação de ERO no processo da congelação é que exista alterações na respiração celular e/ou estado de repouso das células e também pela existência de células espermáticas anormais que morreram aquando da criopreservação (Bailey, et al., 2000).

4.3. Oxidação de Lípidos

Os lípidos são normalmente divididos em dois grupos: os polares e apolares, este último onde se incluem os triglicéridos, que são armazenados em várias células, sendo a principal forma de depósito de energia nos mamíferos (Frühbeck, et al., 2001).

Os lípidos polares são componentes estruturais das membranas das células, que têm como responsabilidade a formação de uma barreira permeável de células e organelos subcelulares numa camada dupla de lípidos. A importância do estado físico da membrana lipídica é evidenciado pelo facto dos lípidos poderem controlar o estado

fisiológico de um organelo da membrana, modificando os seus aspectos biofísicos, tais como a polaridade e permeabilidade. Os lipídios também têm um papel fundamental na biologia como moléculas sinalizadoras (Ayala, et al., 2014).

O dano oxidativo, consequência de stresse oxidativo descontrolado, resulta na lesão das células, tecidos e órgãos. Altos níveis de radicais livres ou espécies reactivas oxigenadas podem danificar directamente os lipídios. A mitocôndria, a membrana plasmática, o reticulo endoplasmático e os peroxissomas são a principal fonte da produção endógena de ERO devido a reacções enzimáticas e/ou oxidação própria de alguns compostos, como catecolaminas e hidroquinonas (Moldovan & Moldovan, 2004).

Existem duas ERO que são conhecidas por afectar de forma significativa os lipídios: o radical hidroxilo (HO^\bullet) e o radical hidroperoxilo (HO_2^\bullet). O radical hidroxilo é uma molécula pouco duradoura que pode ser produzida a partir de oxigénio no metabolismo celular e sob uma variedade de condições de stresse. Além disso, é uma molécula pequena, solúvel em água e que se move rapidamente. Uma única célula produz cerca de cinquenta radicais hidroxilos cada segundo que passa, o que ao final de um dia contabiliza cerca de quatro milhões de moléculas produzidas, que podem neutralizar ou mesmo atacar outras biomoléculas (Lane, 2002). Por outro lado, o radical hidroperoxilo (HO_2^\bullet) também participa fortemente na química da peroxidação lipídica na medida em que origina peróxido de hidrogénio (H_2O_2) que vai reagir com metais redox activos, tais como ferro ou cobre, que por sua vez vai produzir o radical hidroxilo através das reacções de Fento ou Haber-Weiss (Schneider, et al., 2008).

A susceptibilidade dos espermatozóides ao dano oxidativo é atribuída às diferenças individuais na composição de ácidos gordos da membrana das células espermáticas (depende da proporção de ácidos gordos saturados e polinsaturados nos fosfolípidos da membrana das células) (García, et al., 2011), assim como à capacidade antioxidante limitante e a habilidade que as células têm de gerar ERO (Silva, et al., 2010). O stresse oxidativo resulta na queda dos níveis de ATP intracelular, que por sua vez diminui a motilidade espermática e inicia a peroxidação lipídica, que tem sido sugerida como a causa da reacção acrossómica anormal e perda de fluidez da membrana, culminando na perda de potencial fertilizante dos espermatozóides (Ball, 2008).

Assim, a peroxidação lipídica é um processo pelo qual oxidantes, tais como radicais livres e espécies não-radicais, atacam os lípidos que contêm cadeias duplas de carbono. Os lípidos mais atacados são os PUFA (ácidos gordos polinsaturados), que sofrem a abstracção de hidrogénio de um carbono, com a adição de oxigénio, resultando em radicais peroxil lipídicos e hidroperóxidos (Yin, et al., 2011).

4.4. Oxidação de Proteínas

Os principais produtos da oxidação de proteínas são aldeídos, que geralmente perdem a sua função e, desta forma, auxiliam a identificação de alguma disfunção provocada por radicais livres. Um dos responsáveis por danos a proteínas através de radicais livres é o superóxido, que ao reduzir o Fe^{3+} resulta na perda da função da proteína, e o radical hidroxilo, cujas oxidações são intervindas por pequenas quantidades de metais de transição das proteínas, levando a um padrão específico de oxidação de uma determinada proteína. Além desses dois compostos, alguns resíduos que contêm enxofre também apresentam especial função nas células, sendo fáceis de se oxidar. Esses resíduos sulfurados, oxidados, contêm enzimas que catalisam a sua redução de forma a proporcionar funções significativas no controlo do stresse oxidativo das células. Esses danos a proteínas muito dificilmente são reparados, pois muitas vezes as proteínas danificadas são destruídas através de algumas enzimas (Lima, 2010).

4.5. Modificações e quebra de ligações de ADN

O ataque das ERO está dependente de diversos factores que vão influenciar o alvo das mesmas, que pode ser lípidos, proteínas e/ou ADN. Entre esses factores, pode-se evidenciar a origem das ERO, a habilidade de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de iões metálicos associados a essa biomolécula (Evans, et al., 2004). Como o ADN é responsável por todas as informações genéticas que o ser vivo possui, este não pode ser degradado tal como acontece com os lípidos e as proteínas (Berra, et al., 2006).

Quando o ADN reage com as ERO, dá-se a indução de danos oxidativos nas bases do ADN, lesões que resultam da oxidação directa dos ácidos nucleicos e,

momentaneamente, podem levar à formação de quebras numa das cadeias do ADN ou quebras em posições minimamente simétricas nas duas cadeias do ADN, também conhecidas, respectivamente, por SSB (*single stand break*) e DSB (*double stand break*). As quebras simples (SSB) também podem ser responsáveis, na replicação celular, por quebras duplas (DSB) (Berra, et al., 2006).

Ao longo dos tempos várias estratégias foram aperfeiçoadas de forma a tolerar e/ou reparar danos causados pelo stresse oxidativo à molécula de ADN, uma vez que a biologia sempre teve um problema fundamental: o material genético armazenado não é quimicamente inerte, sendo a sua integridade colocada em causa devido ao dano causado por agentes químicos e físicos (Laat, et al., 1999).

O primeiro mecanismo para corrigir as bases oxidadas do ADN é conhecido por BER (*base excision repair*, ou em português, reparo por excisão de bases), que normalmente participa nos danos causados por agentes endógenos. Esse mecanismo começa pelo reconhecimento e excisão das bases danificadas pela enzima ADN glicosilase (Lindahl & Wood, 1999). Isso resulta num local abásico, que é reconhecido pelas enzimas AP-endonucleases, que fazem incisão na extremidade 3' e 5', provocando uma lacuna que é preenchida através de polimerização e ligação de novos nucleótidos à sequência do ADN. Outro mecanismo importante na protecção do material genético é o reparo por recombinação, que oferece suporte à dupla quebra da cadeia de ADN, que por sua vez resulta de vários processos naturais ou então por agentes exógenos, entre eles a irradiação ionizante (Costa, et al., 2001).

Existem outros agentes exógenos que também contribuem para a deformação do material genético, como por exemplo a luz Ultravioleta, sendo o reparo por excisão de nucleótidos (*nucleotide excision repair* ou NER) um dos processos de reconstrução mais importantes (Costa, et al., 2003).

4.6. Mecanismo de combate ao stresse oxidativo

Os antioxidantes, os antioxidantes enzimáticos e os antioxidantes não-enzimáticos são responsáveis pelo combate ao stresse oxidativo (Bansal & Bilaspuri, 2010).

Vários antioxidantes e enzimas antioxidantes são responsáveis por proteger os espermatozoides, encontrando-se no plasma seminal e nas próprias células sexuais masculinas, de forma a prevenir o dano oxidativo (Kim & Parthasarathy, 1998). Os antioxidantes são agentes que conseguem quebrar a reacção da cadeia oxidativa e, desta forma, reduzir o stresse oxidativo. Funcionam, essencialmente, como *scavengers* e supressores na formação de ERO (Miller, et al., 1993).

Certos antioxidantes biológicos e químicos que atacam as ERO e a LPO estão actualmente sob investigação e alguns estudos recentes mostram que a suplementação de diluidores com antioxidantes tem sido uma mais-valia ao fornecer um efeito crioprotector na qualidade do sémen de touro, carneiro, bode, cão e humano, melhorando assim parâmetros seminais, como por exemplo a motilidade espermática e a integridade da membrana, após o descongelamento (Bucaka, et al., 2010).

Também conhecidos por antioxidantes naturais, os antioxidantes enzimáticos neutralizam o excesso de ERO e previnem estas de causar dano na estrutura celular. Esses antioxidantes enzimáticos são compostos por superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR), que também causa a redução de peróxidos de hidrogénio em água e álcool. Por outro lado, os antioxidantes não-enzimáticos não passam de antioxidantes sintéticos ou suplementos dietéticos, sendo o sistema corporal influenciado pela ingestão de antioxidantes, vitaminas e minerais, tais como vitamina C, zinco, taurina, hipotaurina e glutathione (Agarwal & Prabakaran, 2005).

4.7. Antioxidantes

4.7.1. α -tocoferol

O α -tocoferol, também conhecido por vitamina E, é uma pequena molécula antioxidante que tem como função quebrar cadeias causadas pelas ERO, contudo não apresenta uma função de limpeza (Dad, et al., 2006).

Animais com défice de vitamina E são geralmente mais susceptíveis aos efeitos adversos dos agentes ambientais do que animais suplementados. Além disso, a suplementação de vitamina E é saudável para certos grupos da população. No entanto,

suplementar animais que já tenham uma dieta adequada com esse antioxidante nem sempre vai fornecer uma protecção adicional (Chow, 1991).

Na presença de ascorbato e glutathiona (GSH), a actividade que a vitamina E mantém ao quebrar ligações em cadeia é mantida, na sua maioria, pelo ascorbato, enquanto a glutathiona actua como um antioxidante preventivo. Sob essas condições, mesmo quando a quantidade de Vitamina E é mais baixa do que o normal, esta ao juntar-se com a capacidade redutiva do ascorbato garante a actividade de quebra de cadeias suficiente para proteger contra a peroxidação lipídica. Desta forma, a habilidade que o α -tocoferol tem para manter uma taxa estável de redução do radical peróxilo na membrana do plasma depende da reciclagem de α -tocoferol por agentes externos, como ascorbato e tiol (Wefers & Sies, 1988).

4.7.2. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico, ou vitamina C, é considerado um *scavenger* de ERO e, por isso mesmo, é importante na medida em que a sua presença assiste em mecanismos para combater o stresse oxidativo, entre eles, peroxidação lipídica (Knight, et al., 1993).

Segundo um estudo realizado por Agüero, et al. (1995), o ácido ascórbico tem efeitos protectores na integridade da membrana da célula em sémen de garanhão diluído. Agüero, et al. (1995) provaram que a adição de vitamina E antes de armazenar o sémen refrigerado (5°C) resultou num efeito protectivo na membrana do plasma e manteve motilidade progressiva, com ou sem presença de plasma seminal.

Um estudo mais recente foi realizado por Baumber, et al. (2005), que demonstrou que a adição de α -tocoferol e ácido ascórbico não melhoraram a qualidade dos espermatozóides dos garanhões após a descongelação, como a fragmentação de ADN, integridade do acrossoma, viabilidade espermática e potencial da membrana mitocondrial.

5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FERTILIDADE DE SÉMEN

Existem certas características que o espermatozóide deve ter no congelamento e descongelamento para que esteja apto para a fertilização, tais como metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva e a localização de enzimas no acrossoma e proteínas na membrana plasmática. Se o espermatozóide não apresentar qualquer uma dessas características, a sua sobrevivência no trato genital da égua e a ligação do mesmo à membrana plasmática do oócito podem ser comprometidas, podendo reduzir a fertilização. Os espermatozoides, mesmo com produção adequada de energia, podem não ser férteis pois sofrem danos noutros factores (Amman & Pickett, 1987).

O espermatozóide maduro tem três regiões altamente especializadas: a cabeça, onde está presente o ADN, que é importante para a interacção esperma-oócito; o corpo, que contém mitocôndrias que são responsáveis pela produção de energia; e o flagelo, que tem como função a motilidade da célula. O acrossoma, presente na cabeça do espermatozóide, contém enzimas hidrolíticas que são necessárias para ocorrer a penetração do espermatozóide na zona pelúcida do oócito e, assim, ocorrer a fecundação (Yanagimachi, 1994).

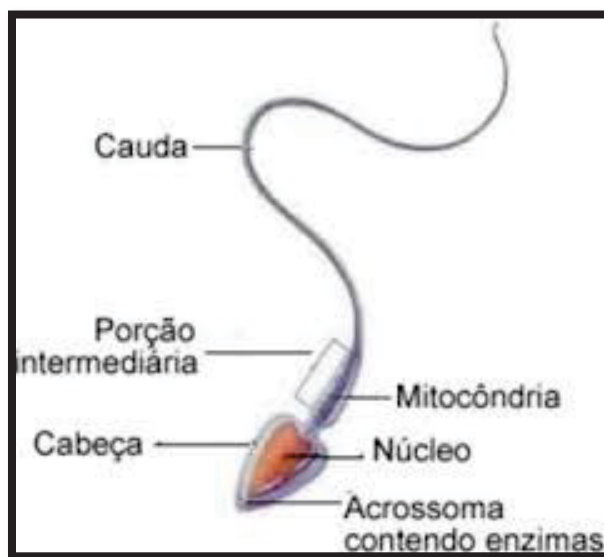


Fig. 2 – Constituição de um espermatozóide de mamífero. Adaptado de <http://www.alunosonline.com.br/biologia/gametogenese.html>.

A reacção acrossômica é um processo essencial para a fertilização, envolvendo a fusão e formação de uma vesícula da membrana do acrossoma com a membrana

plasmástica do espermatozóide, permitindo a libertação das enzimas hidrolíticas. Essa reacção, além de ser um processo irreversível, só ocorre quando o espermatozóide entra em contacto com a zona pelúcida (Yanagimachi, 1994).

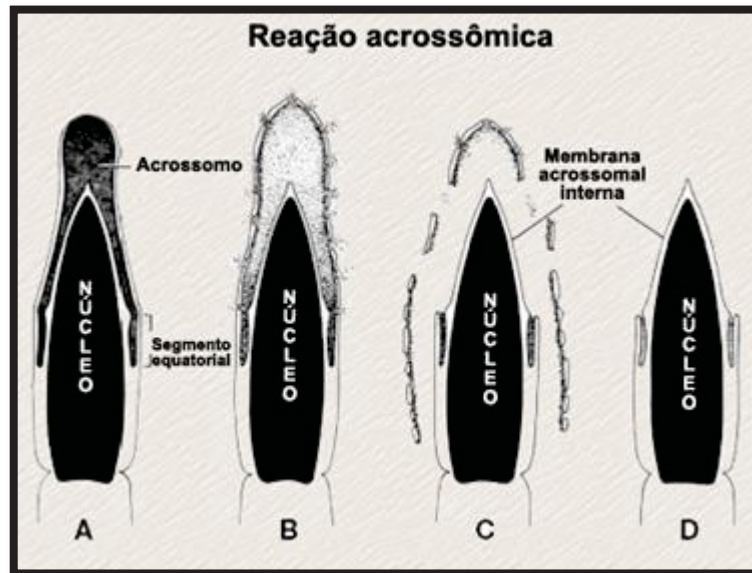


Fig. 3 - Alterações morfológicas na cabeça dos espermatozóides mamíferos durante a reacção acrossômica. A – Vesícula do acrossoma intacta, pré-reacção; B – Fusão da membrana acrossomal externa com a membrana plasmática do espermatozóide, formando as vesículas acrossomais; C) Progressiva perda da membrana e dos conteúdos acrossomais; D- Finalização da reacção acrossômica com a exposição da membrana acrossomal interna. Adaptado de http://200.145.142.234/embriologia_NOVO/EFecundacao_interna_e_externa/5_11.htm.

5.1. Citometria de fluxo

5.1.1. Definição e funcionamento

A citometria de fluxo é uma técnica na qual células suspensas num líquido passam, uma a uma, pelo foco de uma luz, que dispersa características padrões nas células e nos seus componentes; as células são frequentemente distinguidas com marcadores fluorescentes para que aquela luz seja absorvida e então emitida em diferentes frequências. Um sensor, que detecta a luz difundida ou emitida, mede o tamanho e as características moleculares de cada célula; dezenas de milhares de células

podem ser examinadas por minuto e os dados recolhidos são processados por computador (Miller-Keane & O'Toole, 2003).

5.1.2. Marcadores

Existem vários marcadores para as diferentes avaliações realizadas por citometria de fluxo, dividindo-se essencialmente em três tipos: marcadores fluorescentes, pontos de quantum e marcadores de isótopos.

Avaliar o estado do acrossoma e a viabilidade espermática é dos testes mais importante quando se avalia as características qualitativas do sémen por citometria de fluxo, sendo que a maioria dos testes recorrem a marcadores fluorescentes (Peña & Rodríguez, 2006). Assim, a avaliação da viabilidade e estado do acrossoma foi realizada ao corar as amostras incubadas com PI (como marcador para a viabilidade da célula) e FICT-PSA (como marcador para o estado do acrossoma).

A percentagem de mitocôndrias funcionais é proporcional à quantidade de células viáveis e com motilidade uma vez que as mitocôndrias são responsáveis pela produção de energia (ATP) da célula (Thomas, et al., 1998). Como as mitocôndrias são conhecidas por, aparentemente, serem a estrutura celular mais sensível aos processos de criopreservação, o seu estudo é muito importante para a biotecnologia reprodutiva (Silva, 2010). O corante JC-1 normalmente é o mais escolhido por parte dos investigadores pois permite a identificação de vários graus de funcionalidade mitocondrial (Gravance, et al., 2000). Coradas com JC-1, as amostras vão mostrar três subpopulações com alta (fluorescência laranja), média (ambas as cores) e baixa (verde) funcionalidade, por citometria de fluxo. Além disso, é possível, através de um microscópio de fluorescência, diferenciar as subpopulações com alto, médio e baixo potencial da membrana mitocondrial de acordo com a intensidade da fluorescência (Silva, 2010).

Para determinar a peroxidação lipídica da membrana, é usado, por ser o mais fiável, o corante C₁₁-Bodipy^{581/591} (Aitken, et al., 2007), que identifica as células que sofreram danos das ERO na membrana, alterando a sua fluorescência vermelha FL- 3 (591-595 nm), para fluorescência verde FL-1 (450-550 nm) (Drummen, et al., 2004).

Por fim, para avaliar a estabilidade da membrana plasmática utiliza-se a sonda Merocianina 540 (como marcador para a estabilidade da membrana) e Yo-Pro-1 (como marcador para a viabilidade da célula). Os espermatozoides com pobre fluorescência na cabeça são considerados células com estabilidade da membrana do plasma (SMYo-PRO-1 negativo), enquanto as células com rica fluorescência não apresentam estabilidade da membrana plasmática (NSMYo-PRO-1 negativo) e, ainda, uma subpopulação de células espermáticas não viáveis (Yo-PRO-1 positivo) (Hossain, et al., 2011).

5.2. Fertilização *in vitro*

5.2.1. Definição

Fertilização *in vitro* (FIV) é uma técnica de reprodução assistida que consiste na encubação de espermatozoides com oócitos num local que seja capaz de garantir os elementos requeridos para a sua maturação final, a sua fusão e capaz de sustentar as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário (Guérin, et al., 1996).

5.2.2. História

Apesar da fertilização *in vitro* ser uma técnica relativamente recente utilizada em animais domésticos e até seres humanos, desde os anos 30 do século passado que se fazem estudos de oócitos de coelhos.

A história da fertilização *in vitro* começou a sério com Charles Thibault e as suas experiências com coelhos. Foi em 1954 que a primeira fertilização *in vitro* foi realizada com sucesso, recorrendo a oócitos maturados *in vivo* com espermatozoides colectados do útero da fêmea pouco depois do acasalamento (Teixeira, 2010). Ao longo dos anos, Thibault promoveu a investigação da fertilização *in vitro*, até que a 25 de Julho de 1978 deu-se o nascimento do primeiro bebé humano com reprodução assistida, Louise Brown (Cohen, 2005).

No que diz respeito a animais domésticos, foi no início dos anos 80 que se deram os primeiros nascimentos de bezerros, porcos e cordeiros e nos anos 90 de potros. Estudos declaram que os bovinos são os animais domésticos com maior taxa de sucesso de fertilização *in vitro*, sendo que nos últimos vinte anos a produção de embriões tem subido repentinamente. Os anos 80 foram ainda importantes na medida em que houve melhorias no meio de maturação e na capacitação dos espermatozóides e nos anos 90 observou-se um aperfeiçoamento nas culturas dos embriões, sendo possível a cultura *in vitro* dos embriões no estado blastocisto (Block, et al., s.d.).

Segundo Xu & King (1990), a fertilização é um processo complexo que envolve a união de dois gâmetas, reestabelecendo o número de cromossomas somáticos e o início do desenvolvimento de um novo ser vivo. Para que isso aconteça, é imprescindível uma adequada preparação do sémen e dos oócitos, assim como condições de cultura que deverão beneficiar o processo metabólico dos gâmetas masculinos e femininos.

III – METODOLOGIA

1. COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÉMEN

1.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho, sem referência em contrário, foram adquiridos à companhia Sigma Chemical CO. (St. Louis, Mo, USA).

1.2. Colheita e processamento

O sémen foi colectado de três garanhões (dois ejaculados por animal) pelo processo padrão de recolha com égua em estro. Primeiramente, o sémen foi colectado uma vez por dia num total de três dias a todos os garanhões, de forma a esgotar as reservas do epidídimo, assim como analisado o exame andrológico dos mesmos (Anexo I). Depois de dois dias de descanso sexual, o sémen foi colectado pelo processo básico (duas colectas por semana) durante a estação de monta. A recolha foi feita com o auxílio de uma vagina artificial (Missouri model, Minitüb, Tiefenbech, Germany) com um filtro interior que separou a fracção gelatinosa, lubrificado e pré-aquecido a 45-50 °C. A fracção gelatinosa e sujidade do pénis foram filtrados através de uma gaze esterilizada.

O sémen foi, então, diluído numa porção de 1:1 em Kenney (diluidor à base de leite em pó, Anexo 2), pré-aquecido a 37°C. Após a diluição, o sémen foi transportado para o laboratório de Reprodução Animal da Universidade dos Açores numa caixa isolante, que se encontrava à temperatura ambiente, e processado em aproximadamente 30 minutos.

1.3. Primeira avaliação em laboratório

1.3.1. Motilidade

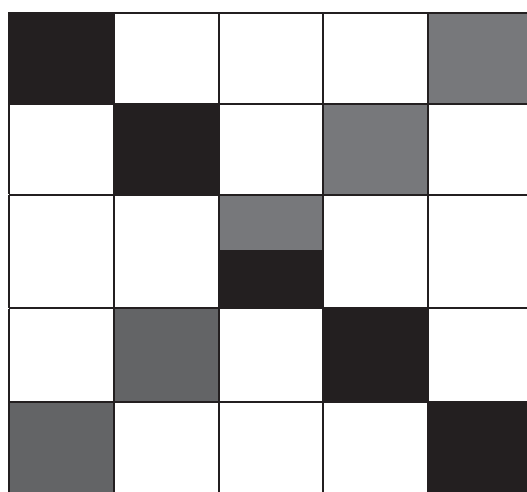
A motilidade espermática avalia-se a nível microscópico. Coloca-se uma gota de sémen entre a lâmina e a lamela, que devem estar pré-aquecidas a 37°C, e prepara-se a objectiva com um aumento de 200x.

A avaliação foi dada de 0-100% observando-se a quantidade de espermatozóides vivos em relação aos mortos, bem como a mobilidade total e progressiva. Quando a amostra era demasiado concentrada, adicionou-se o diluidor Kenney numa porção de 1:1.

As amostras com menos de 70% de motilidade não foram consideradas aptas para o processo de criopreservação.

1.3.2. Concentração espermática

Para a avaliação da concentração espermática, retirou-se, com uma micropipeta, 10 µl da amostra e juntou-se a 1 ml de água destilada (diluição de 1:100). Depois agitou-se com cuidado até ficar bem homogeneizado e preparou-se a Câmara de Neubauer, preenchendo os dois retículos. Deu-se lugar a contagem dos espermatozóides que estavam nos quadrados da diagonal da grelha, como esquematizado na figura que se segue.



Após a contagem calcula-se a média aritmética da contagem das duas diagonais, e o valor encontrado é representado pela letra n . Inserimos esse valor n na seguinte equação e, assim, descobrimos a concentração espermática.

$$\text{Concentração espermática} = \frac{n}{\frac{1}{10} + \frac{5}{25} + \frac{1}{50}} \text{ espermatozóides/mm}^3$$

2. PROCESSO DA CRIOPRESERVAÇÃO

De seguida procedeu-se à remoção do plasma seminal. Para isso, o sémen foi distribuído por tubos de Falcon em iguais quantidades de acordo com o volume do ejaculado e centrifugado a uma velocidade de 600 xg durante dez minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi eliminado e as amostras de sémen foram suspensas a uma concentração final de 100×10^6 spz/ml num meio de congelação comercializado (Gent, Minitub, Iberia, Espanha; Composição: leite desnatado, gema de ovo, açúcares, *buffer*, gentamicina e glicerol (crioprotetor); pH: 6.6 – 6.8; Osmolaridade: 330 – 360) e, depois, divididas em sete tubos de ensaio, cada um correspondente a um diferente tratamento: um sem suplementos (controlo), três suplementados com diferentes concentrações de α -tocoferol (0,5 mM, 1 mM e 2 mM) e os restantes três suplementados com diferentes concentrações de ácido ascórbico (0,45 g/L, 0,9 g/L e 1,8g/L).

Logo depois, as diferentes amostras foram inseridas em palhinhas de 0,5 ml do tipo francês e congeladas através de um congelador programado (SyLab IceCube 14S, Austria), com uma taxa de congelação de acordo Neild, et al., 2005: de $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ dos 20°C - 5°C , $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ dos 5°C aos -15°C e uma velocidade de $-25^\circ\text{C}/\text{min}$ dos -15°C aos -150°C , e depois colocado em azoto líquido até se proceder à avaliação.

3. DESCONGELAÇÃO E AVALIAÇÃO

3.1. Descongelação

As amostras foram retiradas dos tanques de azoto líquido, onde se encontravam guardadas, e descongeladas em banho-maria, com uma temperatura de 37°C , durante 30 segundos.

3.2. Avaliação do sémen

As amostras seminais foram mantidas a uma temperatura de 37°C , e os diferentes parâmetros de qualidade seminal, tais como a viabilidade e reacção acrossómica, o potencial da membrana mitocondrial, a peroxidação da membrana lipídica, e a estabilidade da membrana plasmática, foram determinados nos diferentes

tempos de incubação (T0-0, T1-60 e T2-120 minutos). Estes testes foram realizados por citometria de fluxo (FacsCalibur flow cytometer; Becton Dickinson, San Jose, California, USA), após excitação a 469 nm e emissão de luz verde fluorescente a 541 nm, através de um laser de árgon a 15 mW, a uma taxa de 500-1000 células/s, com recurso ao líquido FACS flow® (líquido do citómetro).

Os dados foram, então, analisados pelo Cellquest®software (Becton Dickinson, San Jose, California, USA). Para cada célula foram identificados o FCS (tamanho), SSC (complexidade), e a intensidade da fluorescência verde (FL1) e fluorescência vermelha (FL3). Para cada amostra, foram avaliados um total de 10 000 espermatozóides, tendo sido determinado o seu tamanho expresso como “Forward scatter” (FSC) e a sua estrutura interna através do “Side scatter” (SSC).

3.2.1. Estado do acrossoma e viabilidade espermática

A avaliação da viabilidade e estado do acrossoma foi realizada ao corar as amostras incubadas com PI (como marcador para a viabilidade da célula) e FICT-PSA (como marcador para o estado do acrossoma), (adaptado por Andrade et al., 2007, e Celeghini et al., 2007).

Para avaliar o estado do acrossoma e viabilidade espermática, diluiu-se as amostras (50×10^6 spz/ml) em PBS (*Phosphate-buffered saline*) de modo a obter uma concentração de 1×10^6 spz/ml num volume final de 2,5 ml, ou seja, retirou-se da amostra inicial 50 μ L de sémen e adicionou-se 2450 μ L de PBS). Esta primeira diluição conta como se fosse o tempo zero (T0), uma hora depois conta como T1 e duas horas depois como T2.

Retirou-se 296 μ L dessa solução e colocou-se no tubo de citómetro pré-aquecido a 37°C, adicionando-se 6 μ L iodeto de propídio (0,5 mg/ml) e 20 μ L de FITC-PSA (100 μ g/ml) e deixou-se encubar durante 10 minutos a 37°C.

Após esse tempo, adicionou-se 300 μ L de PBS e procedeu-se à análise no citómetro.

3.2.2. Potencial da membrana mitocondrial

O composto lipolítico catiónico JC-1 tem a habilidade de marcar diferentemente mitocôndrias com baixo e alto potencial de membrana.

Para avaliar o potencial da membrana mitocondrial (adaptado por Ortega Ferrusola, 2009), diluiu-se as amostras (50×10^6 spz/ml) em PBS de modo a obter uma concentração de 1×10^6 spz/ml num volume final de 2,5 ml, ou seja, retirou-se da amostra inicial 50 μ L de sémen e adicionou-se 2450 μ L de PBS).

Retirou-se 288 μ L dessa solução e colocou-se num tubo de citómetro pré-aquecido a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 12 μ L de JC-1 (153 μ M, n.º catálogo 3168, Molecular Probes Inc., Eugene, OR) e deixou-se encubar durante 10 minutos a 37°C.

Por fim, adicionou-se 300 μ L de PBS e procedeu-se à análise no citómetro.

3.2.3. Peroxidação lipídica

A peroxidação da membrana foi medida com a sonda fluorescente C₁₁-BODIPY^{581/591} (adaprado por Neild et al., 2005, e Andrade et al., 2012).

Para avaliar a peroxidação lipídica da membrana, diluiu-se as amostras (50×10^6 spz/ml) em PBS de modo a obter uma concentração de 1×10^6 spz/ml num volume final de 2,5 ml, ou seja, retirou-se da amostra inicial 50 μ L de sémen e adicionou-se 2450 μ L de PBS).

Retirou-se 290 μ L dessa solução e colocou-se num tubo de citómetro pré-aquecido a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 1 μ L de C₁₁-Bodipy^{581/591} e deixou-se encubar durante 5 minutos a 37°C.

Por fim, adicionou-se 300 μ L de PBS e procedeu-se à análise no citómetro.

3.2.4. Estabilidade da membrana

A estabilidade da membrana plasmática foi examinada ao corar as amostras incubadas com Merocianina 540 (como marcador para a estabilidade da membrana) e

Yo-Pro-1 (como marcador para a viabilidade da célula) (modificado por Rathi et al., 2001, Thomas et al., 2006, e Andrade et al., 2001).

Para avaliar a estabilidade da membrana, diluiu-se as amostras (50×10^6 spz/ml) em PBS de modo a obter uma concentração de 1×10^6 spz/ml num volume final de 2,5 ml, isto é, retirou-se da amostra inicial 50 μ L de sémen e adicionou-se 2450 μ L de PBS).

Retirou-se 290 μ L dessa solução e colocou-se num tubo de citómetro pré-aquecido a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 1 μ L de Yo-PRO-1 e deixou-se encubar durante 70 segundos a 37°C.

Por fim, adicionou-se 300 μ L de PBS e procedeu-se à análise no citómetro.

3.3. Análise estatística

Os dados recolhidos do citómetro foram analisados estatisticamente pelo programa SPSS.

As comparações dos parâmetros do sémen nos diferentes grupos de tratamento em cada tempo (T0, T1 e T2) foram analisadas através do teste de variância (ANOVA *one-way*) e expressos em média + SEM (erro padrão). Os dados percentuais foram normalizados através da transformação do arco seno e submetidos ao teste de homogeneidade, seguindo-se a análise de variância (ANOVA *one-way*) e teste LSD com recurso ao programa estatístico IBM SPSS®v.19 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)

Para todas as análises, $P \leq 0.05$ foi considerado significativamente diferente.

IV – RESULTADOS

1. ESTADO DO ACROSSOMA E VIABILIDADE ESPERMÁTICA

Os espermatozóides foram colocados num dos quatro grupos tem em conta os resultados do citómetro para os padrões de coloração do FITC-PSA e PI.

Tabela 1 – Resultados da coloração do FICT-PSA e PI na avaliação do estado do acrossoma e viabilidade espermática.

Resultado da coloração		Grupo
FICT-PSA	PI	Acrossoma intacto vivo (AIV)
FICT-PSA	PI	Acrossoma intacto morto (AIM)
FICT-PSA	PI	Acrossoma reactivo vivo (ARV)
FICT-PSA	PI	Acrossoma reactivo morto (ARM)
Legenda:	Positivo	Negativo

Não foram encontradas diferentes significantes ($P > 0.05$) para a populações de AIV, AIM e ARM de sémen equino descongelado, nem para os três tempos de incubação, nem para as diferentes concentrações de antioxidantes testados.

Quando comparado a população de sémen ARV entre tratamentos e para um dos tempos de incubação, foi observado que todas as concentrações de α -tocoferol (0.5, 1 e 2 mM) e ácido ascórbico (0.9 e 1.8 g/L) tinham uma maior percentagem de sémen viável ($p \leq 0.05$) quando comparado com o grupo controlo e o grupo com baixo suplemento de ácido ascórbico (0.45 g/L)

Não foram observadas diferenças significativas entre a amostra contendo 0.45 g/L de ácido ascórbico e o grupo controlo em todos os tempos de incubação.

Tabela 2: Avaliação por citometria de fluxo da viabilidade e estado do acrossoma (Média \pm SEM); acrossoma intacto vivo (AIV), acrossoma intacto morto (AIM), acrossoma reactivo vivo (ARV) e acrossoma reactivo morto (ARM), depois da descongelação de sémen com diferentes concentrações de α -tocoferol (mM) e ácido ascórbico (g/L) em meio de congelação, em três tempos de incubação diferentes.

	AIM			ARM			AIV			ARV		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
Controlo	18.5 \pm 2.4 ^a	13.9 \pm 2.4 ^a	16.2 \pm 2.3 ^a	67.6 \pm 3.0 ^a	75.4 \pm 3.2 ^a	73.5 \pm 3.0 ^a	10.9 \pm 1.0 ^a	7.2 \pm 0.6 ^{bc}	6.5 \pm 0.5 ^a	3.0 \pm 0.3 ^a	3.5 \pm 0.5 ^a	3.9 \pm 0.5 ^a
Toco 0.5	14.1 \pm 2.8 ^a	10.7 \pm 3.1 ^a	15.2 \pm 3.5 ^a	67.3 \pm 3.3 ^a	72.4 \pm 3.5 ^a	67.5 \pm 3.8 ^a	6.3 \pm 0.6 ^b	3.6 \pm 0.2 ^a	3.9 \pm 0.3 ^b	12.4 \pm 1.7 ^b	13.4 \pm 1.8 ^{bc}	13.4 \pm 1.7 ^b
Toco 1	13.1 \pm 2.7 ^a	10.6 \pm 3.0 ^a	11.9 \pm 2.9 ^a	65.5 \pm 3.2 ^a	69.5 \pm 3.3 ^a	68.3 \pm 3.6 ^a	6.5 \pm 0.7 ^b	4.1 \pm 0.2 ^{ad}	4.5 \pm 0.4 ^b	14.9 \pm 1.8 ^b	15.8 \pm 2.0 ^b	15.3 \pm 1.9 ^b
Toco 2	14.3 \pm 0.6 ^a	10.0 \pm 2.6 ^a	12.3 \pm 3.1 ^a	62.2 \pm 3.0 ^a	67.0 \pm 3.1 ^a	65.1 \pm 4.0 ^a	10.3 \pm 1.1 ^a	8.1 \pm 0.5 ^b	8.5 \pm 0.8 ^a	13.2 \pm 1.1 ^b	14.9 \pm 1.3 ^b	14.1 \pm 1.2 ^b
Asc 0.45	17.8 \pm 2.6 ^a	17.4 \pm 2.8 ^a	23.3 \pm 3.5 ^a	66.9 \pm 3.1 ^a	71.4 \pm 3.4 ^a	65.6 \pm 4.1 ^a	11.7 \pm 1.0 ^a	7.4 \pm 0.6 ^{bc}	7.3 \pm 0.6 ^a	3.6 \pm 0.4 ^a	3.8 \pm 0.5 ^a	3.8 \pm 0.5 ^a
Asc 0.9	16.9 \pm 2.3 ^a	15.6 \pm 2.6 ^a	18.8 \pm 3.1 ^a	63.3 \pm 2.6 ^a	67.7 \pm 3.3 ^a	60.7 \pm 4.1 ^a	9.2 \pm 0.9 ^{bc}	6.5 \pm 0.4 ^c	7.8 \pm 1.2 ^a	10.7 \pm 0.9 ^b	10.1 \pm 1.0 ^c	12.7 \pm 1.9 ^b
Asc 1.8	15.5 \pm 2.6 ^a	13.9 \pm 2.7 ^a	14.2 \pm 3.2 ^a	63.5 \pm 3.5 ^a	67.0 \pm 3.2 ^a	64.6 \pm 4.0 ^a	7.6 \pm 0.9 ^{bc}	5.0 \pm 0.5 ^d	4.6 \pm 0.4 ^b	13.4 \pm 2.7 ^b	14.1 \pm 2.8 ^{bc}	16.6 \pm 3.5 ^b

O controlo não possui nenhum suplemento de antioxidante. ^{a,b,c}Diferentes letras do alfabeto na mesma coluna indica diferenças significativas, $P \leq 0.05$

2. POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

Para esse teste não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0.05$) para as amostras coradas com JC-1, tanto para os diferentes tempos de incubação, como também para as diferentes concentrações dos antioxidantes testados.

Tabela 3: Avaliação por citometria de fluxo do potencial da membrana mitocondrial (PMM) (Média \pm SEM) depois da descongelação de sêmen com diferentes concentrações de α -tocoferol (mM) e ácido ascórbico (g/L) em meio de congelação, em três tempos de incubação diferentes.

	Alto PMM						Baixo PMM						Média		
	T0		T1		T2		T0		T1		T2		T0	T1	T2
Controlo	31.2 \pm 4.3 ^a	39.0 \pm 4.3 ^{ab}	25.1 \pm 5.2 ^b	68.2 \pm 4.3 ^a	60.4 \pm 4.4 ^{ab}	74.3 \pm 5.2 ^b	74.6 \pm 10.8 ^b	99.3 \pm 11.6 ^b	60.5 \pm 11.4 ^{ab}						
Toco 0.5	36.2 \pm 4.2 ^{ab}	29.3 \pm 2.9 ^a	20.1 \pm 2.3 ^{abc}	63.6 \pm 4.2 ^{ab}	70.3 \pm 3.0 ^a	79.5 \pm 2.3 ^{ab}	85.2 \pm 13.8 ^{ab}	53.8 \pm 4.5 ^a	49.4 \pm 7.0 ^{ab}						
Toco 1	34.1 \pm 3.1 ^{ab}	34.6 \pm 3.0 ^{ab}	22.5 \pm 1.6 ^{abc}	65.6 \pm 3.1 ^{ab}	65.1 \pm 3.1 ^{ab}	77.1 \pm 1.6 ^{ab}	63.0 \pm 6.3 ^b	69.5 \pm 6.0 ^{abc}	43.5 \pm 2.1 ^a						
Toco 2	32.3 \pm 5.0 ^a	35.4 \pm 4.0 ^{ab}	23.3 \pm 2.0 ^{abc}	67.4 \pm 5.0 ^a	64.2 \pm 4.1 ^{ab}	76.5 \pm 2.0 ^{ab}	64.5 \pm 9.3 ^b	74.7 \pm 9.3 ^{ac}	48.4 \pm 3.27 ^{ab}						
Asc 0.45	49.5 \pm 6.8 ^{ab}	47.5 \pm 4.4 ^b	28.0 \pm 4.2 ^{ab}	50.2 \pm 6.8 ^{ab}	51.9 \pm 4.5 ^b	71.5 \pm 4.2 ^{ab}	100.0 \pm 16.7 ^{ab}	88.5 \pm 6.4 ^{abc}	65.0 \pm 10.7 ^b						
Asc 0.9	43.5 \pm 7.6 ^{ab}	38.4 \pm 6.0 ^{ab}	29.3 \pm 3.6 ^{abc}	56.1 \pm 7.6 ^{ab}	61.0 \pm 6.1 ^{ab}	70.4 \pm 3.6 ^{ab}	102.9 \pm 22.4 ^b	87.3 \pm 16.2 ^{abc}	58.5 \pm 6.3 ^{ab}						
Asc 1.8	31.7 \pm 3.3 ^{ab}	36.0 \pm 3.5 ^{ab}	18.4 \pm 2.7 ^{bc}	67.9 \pm 3.3 ^{ab}	63.6 \pm 3.6 ^{ab}	81.2 \pm 2.7 ^b	68.0 \pm 5.7 ^b	73.55 \pm 7.3 ^{bc}	51.8 \pm 6.5 ^{ab}						

O controlo não possui nenhum suplemento de antioxidante. ^{a,b,c} Diferentes letras do alfabeto na mesma coluna indica diferenças significativas, P \leq 0.05

3. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

As amostras suplementadas com α -tocoferol (0.5, 1 e 2 mM) apresentaram percentagem de peroxidação lipídica significativamente mais baixas ($P \leq 0.05$) do que os outros grupos, para todos os tempos de incubação.

Não foram mostradas diferenças significativas de peroxidação lipídica ($P > 0.05$) entre as amostras que continham 0.45 g/mL de ácido ascórbico e o grupo controlo.

Contudo, as amostras com altas concentrações de ácido ascórbico (0.9 e 1.8 g/L) provocaram um aumento significativo ($p \leq 0.05$) de peroxidação lipídica quando comparado com os outros grupos.

Tabela 4: Avaliação por citometria de fluxo da peroxidação lipídica da membrana (Média \pm SEM) depois da descongelação de sémen com diferentes concentrações de α -tocoferol (mM) e ácido ascórbico (g/L) em meio de congelção, em três tempos de incubação diferentes.

	Peroxição lipídica da membrana		
	T0	T1	T2
Controlo	10.6 \pm 0.9 ^b	10.3 \pm 0.5 ^b	10.6 \pm 0.7 ^b
Toco 0.5	8.2 \pm 0.4 ^a	8.3 \pm 0.2 ^a	7.9 \pm 0.1 ^a
Toco 1	7.7 \pm 0.2 ^a	8.3 \pm 0.5 ^a	7.4 \pm 0.1 ^a
Toco 2	7.2 \pm 0.4 ^a	7.1 \pm 0.4 ^a	6.9 \pm 0.1 ^a
Asc 0.45	11.2 \pm 0.7 ^b	11.6 \pm 0.6 ^b	12.5 \pm 0.7 ^b
Asc 0.9	14.0 \pm 0.8 ^c	15.3 \pm 1.0 ^c	15.9 \pm 1.3 ^c
Asc 1.8	15.2 \pm 1.2 ^c	15.6 \pm 1.0 ^c	17.2 \pm 1.6 ^c

O controlo não possui nenhum suplemento de antioxidante. ^{a,b,c} Diferentes letras do alfabeto na mesma coluna indica diferenças significativas, $P \leq 0.05$

4. ESTABILIDADE DA MEMBRANA

A sonda Merocianina 540 identificou dois padrões fluorescentes distintos em sêmen viável (Yo-PRO-1 negativo), em que um foi caracterizado em células pobres em fluorescência e outra com células ricas em fluorescência.

Os espermatozóides com pobre fluorescência na cabeça foram considerados células com estabilidade da membrana do plasma (SMYo-PRO-1 negativo), enquanto as células com rica fluorescência não apresentavam estabilidade da membrana plasmática (NSMYo-PRO-1 negativo) (Hossain, et al., 2011).

Adicionalmente, outra subpopulação de sêmen consiste de células espermáticas não viáveis (Yo-PRO-1 positivo). Os testes realizados à estabilidade da membrana mostraram que as percentagens de células espermáticas SMYo-PRO-1 negativas foram mais baixas ($p \leq 0.05$) em todas as diferentes concentrações de α -tocoferol (0.5, 1 e 2 mM) e na amostra com suplemento de 1.8 g/L de ácido ascórbico, quando comparados com o grupo controlo, para todos os tempos de incubação.

Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0.05$) entre a amostra que continha 0.45 g/L de ácido ascórbico e o grupo controlo, nos três tempos de incubação. Foi também observado que as subpopulações de células espermáticas com NSMYo-PRO-1 negativo e Yo-PRO-1 positivo mostraram percentagens mais altas e baixas ($p \leq 0.05$), respectivamente, nas três amostras suplementadas com α -tocoferol (0.5, 1 e 2 mM) e nas amostras suplementadas com 0.9 e 1.8 g/L de ácido ascórbico, quando comparado com o grupo controlo, para os três tempos de incubação.

Por fim, não foram encontradas diferenças significativas entre as amostras que continham 0.45 g/L de ácido ascórbico e grupo controlo ($P > 0.05$), para os três diferentes tempos de incubação.

Tabela 5: Avaliação por citometria de fluxo da estabilidade da membrana (Média \pm SEM); células viáveis com estabilidade da membrana plasmática (SMYo-PRO-1 (-)), células viáveis sem estabilidade da membrana plasmática (NSMYo-PRO-1 (-)) e células mortas (Yo-Pro-1 (+)), depois da descongelação de sêmen com diferentes concentrações de α -tocoferol (mM) e ácido ascórbico (g/L) em meio de congelção, em três tempos de incubação diferentes.

	SMYo-PRO-1 (-)			NSMYo-PRO-1 (-)			Yo-Pro-1 (+)		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
Controlo	11.7 \pm 0.9 ^a	7.4 \pm 0.5 ^a	7.1 \pm 0.6 ^a	6.3 \pm 0.8 ^a	5.9 \pm 0.8 ^a	6.4 \pm 0.9 ^a	81.1 \pm 1.5 ^a	86.0 \pm 1.3 ^a	86.0 \pm 1.2 ^a
Toco 0.5	5.5 \pm 0.6 ^{bc}	3.5 \pm 0.2 ^{bc}	3.4 \pm 0.3 ^c	18.8 \pm 2.6 ^b	18.7 \pm 2.5 ^b	18.3 \pm 2.4 ^b	75.0 \pm 2.7 ^b	77.3 \pm 2.6 ^b	77.8 \pm 2.6 ^b
Toco 1	5.1 \pm 0.5 ^b	3.7 \pm 0.3 ^b	3.3 \pm 0.3 ^c	21.2 \pm 2.6 ^b	20.4 \pm 2.6 ^b	21.3 \pm 2.5 ^b	73.1 \pm 2.6 ^b	75.5 \pm 2.6 ^b	75.0 \pm 2.6 ^b
Toco 2	6.8 \pm 0.7 ^{bc}	4.6 \pm 0.5 ^{bc}	4.1 \pm 0.5 ^c	19.3 \pm 2.0 ^b	18.6 \pm 2.2 ^b	20.6 \pm 2.1 ^b	73.1 \pm 2.4 ^b	76.2 \pm 2.3 ^b	75.0 \pm 2.3 ^b
Asc 0.45	10.5 \pm 0.8 ^a	6.9 \pm 0.5 ^a	6.2 \pm 0.5 ^{ab}	7.9 \pm 1.1 ^a	6.8 \pm 0.9 ^a	7.1 \pm 1.1 ^a	81.2 \pm 1.5 ^a	86.0 \pm 1.2 ^a	86.3 \pm 1.3 ^a
Asc 0.9	8.3 \pm 0.7 ^{ac}	5.5 \pm 0.4 ^{ac}	5.5 \pm 0.5 ^b	21.9 \pm 2.1 ^b	21.1 \pm 2.3 ^b	21.9 \pm 2.2 ^b	69.3 \pm 2.0 ^b	73.0 \pm 2.3 ^b	72.1 \pm 2.1 ^b
Asc 1.8	6.5 \pm 0.6 ^{bc}	4.4 \pm 0.4 ^{bc}	4.2 \pm 0.3 ^c	22.8 \pm 4.6 ^b	21.9 \pm 4.1 ^b	20.8 \pm 4.0 ^b	70.0 \pm 4.3 ^b	73.0 \pm 4.0 ^b	74.5 \pm 4.0 ^b

O controlo não possui nenhum suplemento de antioxidante. ^{a,b,c} Diferentes letras do alfabeto na mesma coluna indica diferenças significativas, $P \leq 0.05$

V – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objectivo melhorar o processo de criopreservação de sémen equino através da adição de antioxidantes ao meio de congelação, nomeadamente o α -tocoferol e o ácido ascórbico, em diferentes concentrações e tempos de incubação.

Relativamente à suplementação de α -tocoferol, observou-se que este reduziu a peroxidação lipídica ($P \leq 0.05$), responsável pelo stresse oxidativo. Além disso, este antioxidante demonstrou ser um agente benéfico na integridade e estabilidade da membrana dos espermatozóides pós-congelados ($P \leq 0.05$).

No que diz respeito à integridade do acrossoma e ao potencial da membrana mitocondrial, foi verificado que a suplementação dos antioxidantes em nenhum tratamento ajudou nestas características. Foi ainda observado que ao longo do tempo, e independentemente dos tratamentos, a integridade do acrossoma diminuiu e que as mesmas concentrações desses antioxidantes aumentaram a subpopulação ARV (células espermáticas com acrossomas reactivos vivos) e diminuíram a subpopulação de Yo-Pro-1 positivo (células espermáticas mortas) quando comparado com o grupo controlo e baixa concentração de ácido ascórbico (0.45 g/L).

Todas as diferentes concentrações de α -tocoferol e concentrações altas de ácido ascórbico demonstraram que a sua suplementação no meio de congelação possibilitou uma diminuição na percentagem de células mortas, tendo a capacidade de proteger as células nas suas mudanças iniciais a nível da membrana plasmática.

Segundo Baumber et al. (2005), a adição de antioxidantes como o α -tocoferol e o ácido ascórbico em sémen equino criopreservado não apresentam grandes melhorias nos seus parâmetros de qualidade após a descongelação, assim como na fertilidade, ou seja, não aumentam o potencial da membrana mitocondrial, viabilidade espermática, integridade do acrossoma ou motilidade. A remoção do plasma seminal, onde se encontram, originalmente, esses e outros antioxidantes, constitui um perigo para a funcionalidade do sémen após a criopreservação. Isso acontece porque a sua remoção resulta num aumento da concentração de cálcio intracelular e uma maior geração de ERO (Schober, et al., 2007).

Os valores do potencial da membrana mitocondrial foram relativamente baixos, o que acaba por ir de encontro ao facto da mitocôndria ser o organelo da célula espermática mais sensível à congelação e descongelação. Esse resultado pode ser

explicado tendo em conta que a mitocôndria, quando congelada e descongelada, aumenta a produção de ERO, enquanto a osmose pode aumentar a permeabilidade da membrana, permitindo às ERO uma difusão rápida, activando um mecanismo celular semelhante à apoptose (Ortega Ferrusola, et al., 2009).

A peroxidação lipídica é responsável pela perda da fluidez da membrana e por dano causado à mesma, acabando por baixar a motilidade e viabilidade dos espermatozóides (Storey, 1997), o que pode levar a uma capacitação prematura dos espermatozóides e, conseqüentemente, redução da longevidade do sémen criopreservado. A vitamina E, um dos antioxidantes suplementados, é o principal antioxidante do espermatozóide, sendo o maior protector em relação às ERO e peroxidação lipídica, podendo eliminar radicais como o peroxil, alcoxil e outros radicais lipídicos (Silva, 2006), além de se poder reciclar quando as suas condições são baixas. Adicionar vitamina E ao meio de congelação melhora a qualidade do sémen equino após a descongelação, e a adição de α -tocoferol reduz significativamente a peroxidação lipídica (Agüero, et al., 1995).

Quanto ao ácido ascórbico, a sua suplementação não teve grandes efeitos benéficos na qualidade do sémen criopreservado, e para todos os parâmetros, a amostra com baixa concentração de ácido ascórbico (0.45 g/L) não mostrou diferenças significativas com o grupo controlo. Contudo, quando se aumentou a concentração de ácido ascórbico para 0.9 e 1.8 g/L, já se pode observar que essas amostras apresentaram uma melhoria na integridade da membrana e na estabilidade da membrana plasmática.

Essas concentrações mais altas de ácido ascórbico podiam ser utilizadas para futuros processos de criopreservação, não fosse o facto de estas apresentarem um efeito negativo em relação à peroxidação lipídica da membrana ($P \leq 0.05$). O ácido ascórbico não consegue, sozinho, limpar radicais lipolíticos, mas pode reagir com o α -tocoferol de forma a reduzir radicais lipídicos (Linster & Van Schaftingen, 2007). Talvez se adicionássemos os dois antioxidantes no mesmo meio de congelação poderíamos ter melhores resultados.

Os equinos apresentam, em relação aos mamíferos, uma boa capacidade de lutar contra ERO e prevenir o stresse oxidativo *in vivo*, contudo, quando o sémen é criopreservado, existe uma grande produção de ERO e, posteriormente, um aumento da peroxidação lipídica da membrana, dano esse que é ainda mais agravado com a

necessária remoção do plasma seminal, uma vez que grande parte da capacidade antioxidante do sémen está presente neste, de acordo com Schober, et al. (2007) e Baumber & Ball (2005).

Tendo em conta os resultados devolvidos pela investigação, foi concluído que dos dois antioxidantes, o α -tocoferol foi aquele que se apresentou como eficiente, reduzindo o stresse oxidativo causado pelo processo da criopreservação, ao diminuir a peroxidação lipídica do sémen de equinos. O ácido ascórbico não apresentou resultados benéficos para o stresse oxidativo, uma vez que o seu suplemento não melhorou a peroxidação lipídica do sémen avaliado.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A. & Prabakaran, S. A., 2005. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian Journal of Experimental Biology*, Volume 43, pp. 963-974.
- Agüero, A. et al., 1995. Effect of vitamin E addition on equine sperm preservation. *Comunicaciones Biologicas*, Volume 13, pp. 343-356.
- Aitken, R. & Baker, M., 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev*, 16(5), pp. 581-588.
- Aitken, R. J., Wingate, J. K., De Iuliis, G. N. & McLaughlin, E. A., 2007. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol Hum Reprod*, 13(4), pp. 203-211.
- Amman, R. & Pickett, B., 1987. Principles of cryopreservation and a review. *Equi. Vet. Sci, Nova York*, 7(3), pp. 145-174.
- Andrade, A. et al., 2007. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reprod Domest Anim*, 42(2), pp. 190-194.
- Andrade, A. et al., 2012. Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Theriogenology*, 77(9), pp. 1866-1872.
- Aurich, C., 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), pp. 65-75.
- Ayala, A., Muñoz, M. F. & Argüelles, S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2014, p. 31.
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F. & Cormier, N., 2000. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon Minireview. *Journal of Andrology*, 21(1), pp. 1-7.
- Ball, B., 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci*, 107(3-4), pp. 257-267.
- Bansal, A. K. & Bilaspuri, G., 2010. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *SAGE-Hindawi Access to Research*, Volume 2011, pp. 3-4.
- Baumber, J. & Ball, B., 2005. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. *Am J Vet Re*, 66(8), pp. 1415-1419.
- Baumber, J., Ball, B. & Linfor, J., 2005. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am J Vet Res*, 66(5), pp. 772-779.

- Berra, C. M., Menck, C. F. M. & Mascio, P. D., 2006. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. *Química Nova*, 29(6).
- Block, J., Paula, L. & Castro, A., s.d. *Techniques for In-Vitro Embryo Production*, s.l.: ANS 3319C Reproductive Physiology and Endocrinology.
- Bucaka, M. N. et al., 2010. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, 89(1), pp. 24-30.
- Câmara, D. et al., 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 76(2), pp. 342-350.
- Cavalcanti, M., Moura, C., Guerra, M. & Silva, S., 2002. Ação crioprotetora do glicerol e etileno glicol no congelamento do sêmen de cão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 26(3), pp. 174-176.
- Celeghini, E. et al., 2007. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. *Reprod Domest Anim*, 42(5), pp. 479-488.
- Chow, C. K., 1991. Vitamin E and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 11(2), pp. 215-232.
- Cohen, J., 2005. Charles Thibault and assisted reproduction in France. *Reprod Nutr Dev*, 45(3), pp. 291-298.
- Costa, R. et al., 2001. DNA repair-related genes in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). *Genetics and Molecular Biology*, 24(1-4), p. 131.
- Costa, R. M. et al., 2003. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie*, 85(11), pp. 1083-1099.
- Dad, S., Bisby, R. H., Clark, I. P. & Parker, A. W., 2006. Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. *Free Radical Research*, 40(3), pp. 333-338.
- Drummen, G. P., Gadella, B. M., Post, J. A. & Brouwers, J. F., 2004. Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY(581/591). *Free Radic Biol Med*, 36(12), pp. 1635-1644.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M. & Cooke, M. S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 567(1), pp. 1-61.
- Faria, N., 2011. Fertilização In Vitro Heteróloga utilizando ovócitos de bovino e sêmen de garanhão. *Tese de mestrado em Engenharia Zootécnica, Universidade dos Açores*, pp. 30-31.
- Farstad, W., 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), pp. 251-260.

- Ferreira, H. N., 2008. *Efeito da exposição aos crioprotetores glicerol e metilformamida sobre a viabilidade e fertilidade do sêmen eqüino*, s.l.: Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista.
- Frühbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Muruzábal, F. & Burrell, M., 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *The American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, 280(6), pp. 827-847.
- García, B. et al., 2011. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reprod Domest Anim.*, 46(1), pp. 141-148.
- Garrido, N. et al., 2004. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian Journal of Andrology*, Volume 6, pp. 59-65.
- Gravance, C. G., Garner, D. L., Bamber, J. & Ball, B. A., 2000. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, 53(9), pp. 1691-1703.
- Guérin, P., Guyader-Joly, C., Mermillod, P. & LeGuienne, B., 1996. La production in tro et la cryoconservation de l'embryon chez les bovins. *Le Point Vétérinaire*, Volume 28, pp. 857-871.
- Hossain, M. et al., 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J Androl*, 13(3), pp. 406-419.
- Kim, J. G. & Parthasarathy, S., 1998. Oxidation and the spermatozoa. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 16(4), pp. 235-339.
- Klein, B. G., 2012. *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology*. s.l.:Saunders.
- Knight, J., Blaylock, R. & Searles, D., 1993. The effect of vitamins C and E on lipid peroxidation in stored erythrocytes. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 23(1), pp. 51-56.
- Laat, W. L. d., Jaspers, N. G. & Hoeijmakers, J. H., 1999. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & Development*, Volume 13, pp. 768-785.
- Lane, N., 2002. Oxygen: The Molecule that Made the World. *Oxford University Press*, pp. 171-212.
- Lima, M. H., 2010. *Oxidação de proteínas, danos a DNA, câncer e envelhecimento*. [Online] Available at: <http://radlivres2010-1.blogspot.pt/2010/08/oxidacao-de-proteinas-danos-dna-cancer.html>
[Acedido em 10 Outubro 2014].
- Lindahl, T. & Wood, R. D., 1999. Quality Control by DNA Repair. *Science*, 286(5446), pp. 1897-1905.
- Linster, C. & Van Schaftingen, E., 2007. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J*, 274(1), pp. 1-22.
- Mara, L., Casu, S., Carta, A. & Dattena, M., 2013. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim Reprod Sci*, 138(1-2), pp. 25-38.

- Mazur, P., Leibo, S. & Chu, E., 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exp. Cell Res.*, 71(2), pp. 345-355.
- Miller, J. K., Brzezinska-Slebodzinska, E. & Madsen, F. C., 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*, 76(9), pp. 2812-2823.
- Miller-Keane & O'Toole, M. T., 2003. *Miller-Keane Encyclopedia & Dictionary of Medicine, Nursing & Allied Health*. 7 ed. s.l.:Saunders.
- Moldovan, L. & Moldovan, N., 2004. Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4), pp. 395-412.
- Moreira, C., 2010. *Espermatogénesese*. [Online].
- Neild, D. et al., 2005. Lipid Peroxidation Formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 72(2), pp. 230-238.
- Ortega Ferrusola, C. et al., 2009. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*, Volume 138, pp. 55-63.
- Özkavukcu, S. & Erdemli, E., 2002. Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*, 24(4), pp. 187-196.
- Papa, F., Alvarenga, M. & Dell'Aqua, J., 2007. *Manual de Andrologia e Manipulação de Sêmen Equino*. s.l.:s.n.
- Pegg, D., 2007. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*, Volume 368, pp. 39-57.
- Pena, F. J. et al., 2009. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), pp. 345-349.
- Peña, F. J. & Rodríguez, H., 2006. Citometría de flujo: aplicaciones en el estudio del espermatozoide porcino. *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino: Biotecnología de la Reproducción Porcina*, pp. 133-144.
- Polge., C., Smith, A. & Parkes, A., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, Volume 164, p. 666.
- Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M. & Gadella, B., 2001. Evaluation of In Vitro Capacitation of Stallion Spermatozoa. *Biol Reprod*, 65(2), pp. 462-470.
- Read, A., 1999. *The New International Webster's Comprehensive Dictionary of the English Language*. s.l.:Trident Press International.
- Schneider, C. et al., 2008. Intermolecular peroxy radical reactions during autoxidation of hydroxy and hydroperoxy arachidonic acids generate a novel series of epoxidized products. *Chemical Research in Toxicology*, 21(4), p. 895-903.
- Schober, D., Aurich, C., Hohl, H. & Gille, L., 2007. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 68(5), pp. 745-754.

- Sieme, H., Harrison, R. & Petrunkina, A., 2008. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), p. 276–292.
- Sikka, S., 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*, 25(1), pp. 5-18.
- Sikka, S., Rajasekaran, M. & Hellstrom, W., 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology*, 16(6), pp. 464-468.
- Silva, C. d., 2010. Efeito da melatonina em espermatozoides de equino. *Tese de Mestrado da Faculdade de Medicina Veterinária*, p. 32.
- Silva, F. M. d., Marques, A. & Chaveiro, A., 2010. Reactive Oxygen Species: A Double-Edged Sword in Reproduction. *The Open Veterinary Science Journal*, Volume 4, pp. 127-133.
- Silva, J. R., Agrícola, R., Barbosa, M. & Costa, L. L. d., 2007. Variação sazonal do volume testicular, da produção e qualidade do sêmen e do comportamento sexual de cavalos Lusitanos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102(561-562), pp. 119-125.
- Silva, N. et al., 2013. Ação de antioxidantes na manutenção da viabilidade espermática de sêmen bovino criopreservado. *Enciclopédia Biosfera*.
- Silva, P., 2006. Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. *PhD thesis. Utrech University, Ridderprint, Ridderkerk*, pp. 5-36.
- Sittig, M., 1963. *Cryogenics: Research and Applications*. New York: D. Van Nostrand Company, Inc.
- Squires, E., Keith, S. & Graham, J., 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 62(6), pp. 1056-1065.
- Stewart, D., 1950. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *Vet Rec*, Volume 62, pp. 115-116.
- Storey, B., 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 3(3), pp. 203-213.
- Teixeira, S. P., 2010. Implementation of the technique by cryopreservation of immature oocytes and subsequent in vitro maturation and fertilization post-thawing. *Master dissertation in Engenharia Zootécnica, University of the Azores*, p. 8.
- Thomas, A., Meyers, S. & BA, B., 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, 65(8), pp. 1531-1550.
- Thomas, C. A., Garner, D. L., DeJarnette, J. M. & Marshall, C. E., 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod*, 58(3), pp. 786-793.
- Varner, D. D., 2000. *Cryopreservation of Equine Semen - Where Do We Go From Here?*. Texas, USA, s.n., p. 1.

- Watson, P., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, Volume 60-61, pp. 481-492.
- Wefers, H. & Sies, H., 1988. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur. J. Biochem*, 174(2), pp. 353-357.
- Xu, K. & King, W., 1990. The biology of mammalian fertilization and embryo development. *AgBiotech News and Information*, 2(1), pp. 25-28.
- Yanagimachi, R., 1994. Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*, Volume 1, p. 189–317.
- Yang, W. & Mochizuki, S., 2003. Low temperature and cryogenic applications in medicine and surgery. *NATO Science Series*, Volume 99, pp. 295-308.
- Yin, H., Xu, L. & Porter, N., 2011. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), p. 5944–5972.

VII – ANEXOS

ANEXO 1: EXAME ANDROLÓGICO



CERTIFICADO ANDROLÓGICO

Universidade dos Açores Secção de Reprodução

Exame Andrológico

A. IDENTIFICAÇÃO DO REPRODUCTOR

Nome:	Raça:	Idade:	Registro:
Proprietário:		Propriedade:	
Endereço:			

B. EXAME CLÍNICO

Histórico:		
Geral:		
Sistema Genital:	Prepúcio:	Pénis:
Testículos:	Esquerdo:	Direito:
Dimensões (comp., larg., alt)		
Simetria		
Forma		
Posição		
Sensibilidade dolorosa		
Mobilidade		
Epidídimo		
Genitália interna		
Comportamento sexual (líbido)		

C. ESPERMIOGRAMA

Método da Colheita: Vagina Artificial	Data:	Horário:
Características do Ejaculado:		
Volume do ejaculado: mL	Aspecto:	Vigor (0-5):
Cor:	Motibilidade:	Concentração:
Características morfológicas (anexo I):		
Defeitos maiores: %	Defeitos menores: %	Total: %

Outros Elementos:

D. OBSERVAÇÕES:

E. CONCLUSÃO:

Angra do Heroísmo,.... de 20../20..

CERTIFICADO DE EXAME ANDROLÓGICO – ANEXO I

Nome:

Registro:

MORFOLÓGIA ESPERMÁTICA

a. TOTAL DE DEFEITOS MAIORES: %

1. <u>Acrossoma:</u>
2. <u>Patologia da Cabeça:</u>
• Subdesenvolvida
• Isolada patológica
• Estreita na base
• Pequena anormal
• Contorno anormal
• Piriforme
• "Pouch formation"
3. <u>Gota proximal:</u>
4. <u>Formas teratológicas:</u>
5. Defeito de peça intermédia (desfibrilação, fractura, edema, pseudogota)
6. <u>Patologia da Cauda:</u>
• Fortemente dobrada ou enrolada
• Dobrada com gota
• Enrolada na cabeça
7. <u>Formas duplas:</u>

b. TOTAL DE DEFEITOS MENORES: %

1. <u>Patologia da cabeça:</u>
• Delgada
• Gigante, curta, latga, peq. Normal
• Isolada normal
2. <u>Patologia da Cauda e implantação:</u>
• Retro e abaxial, oblíquo
• Dobrada ou enrolada
3. <u>Gota Citoplasmática Distal:</u>

c. TOTAL DE FORMAS ANORMAIS: %

Outros elementos

1. Medusa:	5. Hemácias:
2. Células primordiais:	6. Células epiteliais:
3. Células gigantes:	7. Cristais de urina:
4. Leucócitos:	8. Bactérias:

ANEXO 2: PREPARAÇÃO DO MEIO DILUIDOR “KENNEY”

Material necessário:

- Água destilada (recipiente castanho);
- D-glucose (1.2, n.º 30);
- Leite em pó desnatado;
- Balão volumétrico;
- Funil;
- Balança;
- Agitador magnético;
- Íman.

Preparação para 1 litro de solução:

1. Adicionar 49g de D-glucose a 500 ml de água destilada no balão volumétrico;
2. Juntar 24g de leite em pó desnatado;
3. Deixar misturar;
4. Após a solução ficar homogênea, juntar mais 500 ml de água destilada;
5. Misturar novamente.